

**“Voltage clamp” - Untersuchungen an
kurzen Muskelfasern des Frosches zum Einfluß von
Ca-Ionen auf die Inaktivierung der mechanischen Kraft**

Dissertation
zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von
Dorothea Berwe

Bochum 1985



Digitized by the Internet Archive
in 2026

"Voltage clamp"-Untersuchungen an kurzen Muskelfasern des
Frosches zum Einfluß von Ca-Ionen auf die Inaktivierung
der mechanischen Kraft

Dissertation

zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von

Dorothea Berwe

Bochum 1985

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	17
2.1 Präparate	17
2.2 Versuchsanordnung und -auswertung	17
2.2.1 Versuchsaufbau	17
2.2.2 Messung und Auswertung der mechanischen Inaktivierung	19
2.2.3 Messung und Auswertung der Wiederherstellung der Kraft nach einer vollständigen Inaktivierung	22
2.3 Lösungen und Substanzen	25
2.3.1 Zusammensetzung der wichtigsten Versuchslösungen	25
2.3.2 Die Herstellung der Dantrolenlösung	26
2.3.3 Die Herstellung Ca^{2+} -freier Lösungen	27
2.3.4 Der Wirkungsmechanismus von Quin-2	28
2.3.5 Die Methode der Stoffwechselvergiftung	32
3. Ergebnisse	33
3.1 Die Verschiebung der Inaktivierungskurve durch Verlängerung des konditionierenden Vorpulses oder Entzug des extrazellulären Calciums	33
3.2 Der Einfluß von Na-Dantrolen auf die mechanische Inaktivierung	37
3.3 Die Zeitabhängigkeit der Inaktivierung in Ca^{2+} -freier Versuchslösung	44
3.4 Die Wirkung von Quin-2 auf die mechanische Inaktivierung	48
3.5 Die Reduktion der Kontraktionsamplitude durch repetitive Reizung an stoffwechselvergifteten Muskelfasern	55
3.6 Die Wiederherstellung der Kontraktionskraft nach vollständiger Inaktivierung der mechanischen Aktivität	59

	Seite
3.6.1 Die Wiederherstellung der Kontraktionskraft in Ca^{2+} -freier Versuchslösung	60
3.6.2 Untersuchungen zur Temperaturabhängigkeit des "repriming"-Prozesses	62
3.6.3 Der Einfluß des Membranpotentials auf die Wiederherstellung der Kontraktionskraft	64
4. Diskussion	69
4.1 Inaktivierung, Paralyse und Wiederherstellung der elektromechanischen Kopplung	69
4.1.1 Inaktivierung und "restoration" in Ca^{2+} -haltigen Lösungen	69
4.1.2 Die Wirkung von Ca^{2+} -freien Lösungen	73
4.1.3 Modelle zur Interpretation der Rolle von Ca-Ionen bei der elektromechanischen Kopplung	78
4.1.3.1 Die Beeinflussung der "charge movement" durch direkte Bindung von Ca-Ionen	78
4.1.3.2 Die potentialabhängige Bindung von Ca-Ionen an das Kontrollsystem in der T-Tubulusmembran	80
4.1.4 Die Wirkung von Quin-2	81
4.2 Die Wirkung von Dantrolen auf die elektromechanische Kopplung	84
4.3 Spielt der Inaktivierungsprozeß bei der "Erschöpfung" stoffwechselvergifteter Muskelfasern eine Rolle?	86
4.4 Schlußfolgerungen	89
5. Zusammenfassung	90
6. Literaturverzeichnis	93

1. EINLEITUNG

An allen Muskelfasern stellt eine Änderung des Membranpotentials in Richtung Depolarisation den spezifischen Auslöser für die Kette von Ereignissen dar, die letztlich zur Kontraktion des Muskels führen. Bei den Zuckungsfasern der Wirbeltiere ist unter physiologischen Bedingungen ein regeneratives Aktionspotential an der Außenmembran für die Weiterleitung der Erregung über die gesamte Muskelfasermembran verantwortlich. Von der Zelloberfläche breitet sich die Erregung über das transversale tubuläre System (T-System, T-Tubuli) ins Zellinnere aus, wird durch einen bislang noch unbekannten Mechanismus auf das sarkoplasmatische Retikulum (SR) übertragen und induziert dort die Freisetzung von Ca-Ionen (Ca^{2+}) aus den Terminalzisternen. Die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration leitet die Prozesse ein, die zur Aktivierung des kontraktilen Apparates und damit zur Kontraktion der Muskelfaser führen. Durch die Reabsorption der Ca-Ionen in das sarkoplasmatische Retikulum wird die erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration wieder bis auf den Ruhewert reduziert. Die Erschlaffung der Muskelfaser setzt ein. Die Gesamtheit der Prozesse, die eine elektrische Erregung der Muskelfasermembran in eine Aktivierung der kontraktilen Filamente umsetzen, wird unter dem Begriff elektromechanische Kopplung zusammengefaßt ("excitation contraction coupling", SANDOW, 1952).

Nach HODGKIN und HOROWICZ (1960) werden Amplitude und zeitlicher Verlauf einer mechanischen Kraftentwicklung durch die Überlagerung zweier gegensätzlich wirkender Prozesse bestimmt. Diese Prozesse werden als Aktivierung und Inaktivierung der mechanischen Kraft bezeichnet. Im Mittelpunkt meiner Arbeit stehen Untersuchungen zu den Vorgängen, die bei der mechanischen Inaktivierung ablaufen. Aus diesem Grunde werden im folgenden Teil der Einleitung einzelne Teilschritte der elektromechanischen Kopplung dargestellt, die wichtig für das

Verständnis der Thematik dieser Arbeit sind. Anschließend wird eine Übersicht über die zur Zeit diskutierten Vorstellungen zur Inaktivierung der mechanischen Kraft gegeben.

Erregungsübertragung vom T-System auf das SR (T-SR Kopplung)

Bei dem T-System handelt es sich um röhrenförmige Einstülpungen ($\varnothing$ ungefähr 20 bis 80 nm) der Oberflächenmembran ins Zellinnere, so daß eine offene Verbindung vom Lumen der Röhren zum Extrazellulärraum besteht (H.E. HUXLEY, 1964; PAGE, 1964; ENDO, 1966). Das SR verläuft longitudinal durch das Sarkoplasma und tritt dabei in engen Kontakt mit den Myofibrillen. Es leitet sich vom rauhen endoplasmatischen Retikulum ab, ist also intrazellulären Ursprungs. Bei den quergestreiften Muskelfasern dient das SR als Ca^{2+} -Speicher und zur Ca^{2+} -Regulation. Aus den Terminalzisternen des SR werden bei Erregung die zur Kontraktionsaktivierung benötigten Ca-Ionen freigesetzt (HASSELBACH & MAKINOSE, 1961). Die Reabsorption der Ca-Ionen in das Lumen des SR zur Wiederherstellung der Ruhe- Ca^{2+} -Konzentration erfolgt durch stoffwechselabhängige Pumpen in der SR-Membran. Die Terminalzisternen des SR liegen zu beiden Seiten eines T-Tubulus, von dem sie durch einen Spalt von nur 12 bis 14 nm getrennt sind (junctional gap). Die Konfiguration ein T-Tubulus und zwei Terminalzisternen wird als Triade bezeichnet. In diesem Bereich findet die Erregungsübertragung vom T-System auf das SR statt. Bei diesem Prozeß haben möglicherweise Membranstülpungen des SR, die sogenannten "Füßchen" ("feet", FRANZINI-ARMSTRONG, 1970), eine wichtige Funktion. Im Elektronenmikroskop erscheinen die "Füßchen" als elektronendichte Strukturen, wobei der Kern elektronendurchlässiger ist als der Rand (SOMLYO, 1978, 1979; EISENBERG & GILAI, 1979; FRANZINI-ARMSTRONG & NUNZI, 1983).

Das im SR gespeicherte Calcium ist auch unter Ruhebedingungen ungleichmäßig auf die verschiedenen Abschnitte verteilt und liegt nur zum Teil in ionaler Form vor. Die Ursache dafür ist die partielle Bindung des Calciums an zwei Proteine, die unterschiedliche Ca^{2+} -Affinität besitzen und unterschiedlich

im SR verteilt sind. Bei dem einen Protein handelt es sich um Calsequestrin (MACLENNAN & WONG, 1971). Calsequestrin ist durch eine hohe Ca^{2+} -Bindungskapazität (45 mol Ca^{2+} /mol Protein) gekennzeichnet, hat jedoch nur eine niedrige Affinität für Ca^{2+} (MACLENNAN & HOLLAND, 1975). Es befindet sich hauptsächlich in den Terminalzisternen des SR und ist daher für die hohe Ca^{2+} -Konzentration von 50 mM in diesem Bereich verantwortlich (CAMPBELL, FRANZINI-ARMSTRONG & SHAMOO, 1980). Das zweite Ca^{2+} -bindende Protein im SR-Lumen besitzt eine Bindungsstelle mit hoher Affinität für Ca^{2+} und etwa 25 Bindungsstellen mit geringer Ca^{2+} -Affinität. Dieses Protein konnte bislang nur im longitudinalen Tubulus gefunden werden (CAMPBELL et al., 1980).

Zur Erregungsübertragung vom T-Tubulus auf das sarkoplasmatische Retikulum wurden in den letzten Jahren mehrere Hypothesen entwickelt. Die meisten dieser Hypothesen ließen sich experimentell jedoch nicht bestätigen. Gegenwärtig stehen zwei verschiedene Funktionsmechanismen im Zentrum der Diskussion. Im dem Kopplungsmodell, das ursprünglich auf SCHNEIDER und CHANDLER (1973) zurückgeht, werden durch die Depolarisation des T-Systems geladene Molekülgruppen in der T-Tubulusemembran bewegt. Dies führt über eine Konformationsänderung in Strukturen, die den "junctional gap" überbrücken, zur Öffnung von Ca^{2+} -Kanälen in der SR-Membran. Dieser Hypothese gegenüber steht die Vorstellung, daß die Signalübertragung von der T-Tubulusemembran auf das SR durch einen chemischen Transmitter erfolgt. Seit langem wird hier Ca^{2+} als Botenstoff diskutiert ("trigger"- Ca^{2+} -Hypothese).

Das "charge movement"-Modell (SCHNEIDER & CHANDLER, 1973; CHANDLER, RAKOWSKI & SCHNEIDER, 1976a, b; SCHNEIDER, 1981). Die intramembranaln Ladungsverschiebungen, die zur Entwicklung des "charge movement"-Modells führten, wurden erstmals von SCHNEIDER und CHANDLER (1973) unter besonderen Versuchsbedingungen im "voltage clamp"-Experiment nachgewiesen. Seither wurden immer mehr Parallelen zwischen den Eigenschaften der elektromechanischen Kopplung und den Ladungsverschiebungen gefunden. So zeigen Aktivierungs- und Inaktivierungskurve für die "charge movement" (CHANDLER et al., 1976a)

eine ebenso sigmoide, jedoch weniger steile Potentialabhängigkeit wie Aktivierungs- und Inaktivierungskurve für die mechanische Kraft (HODGKIN & HOROWICZ, 1960; vgl. S. 9). Bei Auslösung einer Schwellenkontraktion unter verschiedenen Bedingungen (Pulsdauer) wird stets die gleiche Menge an Ladungsverschiebungen registriert (SCHNEIDER & HOROWICZ, 1979; HOROWICZ & SCHNEIDER, 1981). Auch zwischen der Inaktivierung und der Wiederherstellung der mechanischen Kraft nach einer Inaktivierung und den "charge movement" bestehen viele Analogien, die jedoch an anderer Stelle (s.u.) dargestellt werden sollen.

Die "charge movement" werden im "voltage clamp"-Experiment sichtbar, wenn die Ionenströme blockiert sind und die lineare Komponente des kapazitiven Stromes (Umladung der Membran) kompensiert ist. Zu Beginn der Depolarisation wird ein transienter Auswärtsstrom gemessen ("on"-Phase) und bei Repolarisation ein transienter Einwärtsstrom ("off"-Phase). Dabei sind die Integrale der Stromaufzeichnungen während der "on"- und der "off"-Phase annähernd gleich groß (SCHNEIDER & CHANDLER, 1973; ADRIAN & ALMERS, 1976; CHANDLER et al., 1976a).

Nach neueren Ergebnissen bestehen die "charge movement" aus drei Teilkomponenten (Q_a , Q_β , Q_γ), die sowohl pharmakologisch wie auch durch die unterschiedliche Potentialabhängigkeit ihrer Inaktivierung voneinander unterschieden werden können (HUANG, 1982). Aktivierungs- und Inaktivierungskurve für die Ladungskomponente Q_γ stimmen sowohl in der Steigung wie auch in der Potentialabhängigkeit sehr gut mit Aktivierungs- und Inaktivierungskurve für die mechanische Kraft überein (HUANG, 1982; HUI, 1983b). Q_γ fehlt bei Experimenten, bei denen eine Kraftentwicklung unterdrückt wird, so in hypertonen Lösungen und in Versuchslösungen, in denen die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR pharmakologisch blockiert wird (CHANDLER et al., 1976a; GILLY & HUI, 1980; HUANG, 1982; HUI, 1982, 1983a, b). Aus diesem Grunde wird Q_γ direkt mit der Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR in Verbindung gebracht. Die Komponente Q_β steht möglicherweise mit der Bildung von zusätzlichen "Füßchen" zwischen T-Tubulus und SR im Zusammenhang (HUI, 1982a). Nach EISENBERG

und EISENBERG (1982) erhöht sich die Anzahl der "Füßchen" während einer durch Depolarisation induzierten Kontraktion. Über die Funktion der Ladungskomponente Q_a gibt es bislang noch keine konkrete Vorstellung. Es sprechen jedoch einige Beobachtungen - wie z.B. die geringe Spannungsabhängigkeit - dafür, daß Q_a keine direkte Rolle bei der Aktivierung des kontraktile Systems zuzuordnen ist (ADRIAN & ALMERS, 1976; ADRIAN & PERES, 1979).

CHANDLER, RAKOWSKI und SCHNEIDER (1976b) entwickelten auf Grund der ersten "charge movement"-Experimente ein Modell, in dem sie ihre Vorstellungen zur Beteiligung der Ladungsbewegungen an der elektromechanischen Kopplung erläutern: Es existiert in der Triade eine direkte Kopplung zwischen T-Tubulus und Terminalzisterne. Jeweils eine Kopplungsstruktur verschließt einen Ca^{2+} -Kanal in der SR-Membran. Als morphologische Äquivalente für diese Kopplungsstrukturen werden die "Füßchen" angesehen. Bei einer Bewegung von Ladungsträgern, die sich in der T-Tubulusmembran befinden und möglicherweise Bestandteil des Kopplungsstückes sind, werden die Kopplungsstrukturen bewegt oder verändert. Dabei öffnen und schließen sich die Ca^{2+} -Kanäle in der SR-Membran. Die Position der Ladungsträger in der T-Tubulusmembran ist abhängig von dem elektrischen Feld über der Membran. Im Ruhezustand der Muskelfaser, also während des Ruhepotentials, befinden sie sich vorwiegend an der dem SR gegenüberliegenden Innenseite der T-Tubulusmembran (Stadium I: Ruhezustand). Das Kopplungsstück verschließt die Ca^{2+} -Kanäle. Bei einer Umkehrung des elektrischen Feldes über der T-Tubulusmembran - z.B. während eines Aktionspotentials - verschieben sich die Ladungsträger an die luminale Seite der T-Tubulusmembran (Stadium II: aktivierter Zustand). Dabei verändert sich die Lage oder die Form der Kopplungsstruktur. Die Ca^{2+} -Kanäle im SR werden geöffnet und die gespeicherten Ca-Ionen freigesetzt. Bei Repolarisation schließen sich die Ca^{2+} -Kanäle wieder unter dem Einfluß des Potentials über der T-Tubulusmembran. Die freigesetzten Ca-Ionen werden durch die Ca^{2+} -Pumpen des SR sequestriert.

Die "trigger"- Ca^{2+} -Hypothese (BIANCHI, 1968, 1969; FRANK, 1978a, b, 1979, 1980, 1982)

Die Vorstellung von einer Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -Freisetzung ist schon alt. Im Laufe der Jahre wurde diese Hypothese unter Berücksichtigung der jeweils neuesten experimentellen Befunde immer weiter modifiziert (FRANK, 1958, 1960; BIANCHI & SHANES, 1959; STEFANI & CHIARANDINI, 1973). Das letzte Modell wurde 1982 von FRANK entwickelt. Danach existieren im Bereich der Triaden zwei verschiedene Ca^{2+} -Speicher, die an dem Prozeß der T-SR Kopplung beteiligt sind: Der "trigger pool" besteht aus speziellen Ca^{2+} -Bindungsstellen an der dem SR zugewandten Seite der T-Tubulismembran. Bei dem zweiten Speicher, dem "activator pool", handelt es sich um die Terminalzisternen des SR (BIANCHI, 1979; FRANK, 1979, 1980). Durch eine Depolarisation der T-Tubulismembran wird ein Teil der dort gebundenen Ca-Ionen freigesetzt. Diese Ca-Ionen diffundieren durch den "junctional gap" zur Terminalzisterne des SR und induzieren dort eine regenerative Ausschüttung größerer Ca^{2+} -Mengen in das Myoplasma. Die daraus resultierende Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt zur Aktivierung des mechanischen Systems. Gleichzeitig werden die Speicher für das "trigger"- Ca^{2+} wieder aufgefüllt und die Ca^{2+} -Pumpen am SR und an der Außenmembran der Faser aktiviert. Die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration wird wieder auf den Ruhewert erniedrigt, und die Faser erschlafft. Um die Abhängigkeit der Zuckungshöhe von der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und von anderen mehrwertigen Kationen zu erklären, postuliert FRANK zusätzliche Ca^{2+} -Bindungsstellen an der luminalen Oberfläche der T-Tubulismembran. Eine Besetzung dieser Bindungsstellen mit Calcium bei hoher extrazellulärer Ca^{2+} -Konzentration verstärkt die Bindung des "trigger"- Ca^{2+} an die Innenseite der Membran, so daß bei Depolarisation weniger "trigger"- Ca^{2+} freigesetzt wird. Eine niedrige extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration hat den gegenteiligen Effekt. Niedrige Konzentrationen anderer mehrwertiger Kationen wirken sich wie ein Entzug der extrazellulären Ca-Ionen aus, während eine hohe Kationenkonzentration (z.B. an Mn^{2+} oder La^{3+}) die Freisetzung von "trigger"- Ca^{2+} vollständig blockiert. Für dieses Modell spricht, daß unter bestimmten Versuchsbedingungen experimentell eine Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung gezeigt werden konnte (FORD & PODOLSKY, 1970; ENDO, TANAKA & OGAWA, 1970. Zusammenfassungen:

STEPHENSON, 1981; FABIATO, 1983). Ohne weitere Annahmen läßt sich mit der "trigger"-Ca²⁺-Hypothese jedoch nur schwer erklären, daß die Ca²⁺-Freisetzung aus dem SR strikt unter der Kontrolle des Membranpotentials bleibt (ASHLEY & RIDGWAY, 1970).

Nach FABIATO (1983) läßt sich die "trigger"-Ca²⁺-Hypothese mit den Ladungsbewegungen in dem "charge movement"-Modell von SCHNEIDER et al. (1976b) verbinden. Danach wäre der erste Schritt in der T-SR Kopplung das "charge movement"-Signal in der T-Tubulusemembran. Diese Ladungsbewegungen könnten als zweiten Schritt die Diffusion von an der inneren T-Tubulusemembran gebundenen Ca²⁺-Ionen zu den Terminalzisternen induzieren.

Bei der Diskussion um eine chemische Überträgersubstanz zwischen T-Tubulus und SR muß neuerdings außer den Ca-Ionen auch Inositol-1,4,5-trisphosphat als zweiter Kandidat berücksichtigt werden. Durch die Injektion dieser Substanz kann an den verschiedensten Geweben, so auch an der glatten Muskulatur und an der Skelettmuskelfaser, eine Ca²⁺-Freisetzung aus intrazellulären Speichern induziert werden (SUEMATSU, HIRATA, HASHIMOTO & KURIYAMA, 1984; VERGARA & TSIEN, 1985; VOLPE, SALVIATI, DI VIRGILIO & POZZAN, 1985).

Ca²⁺-bindende Proteine in der Zelle

Nach der T-SR Kopplung setzt die Ca²⁺-Ausschüttung aus den Terminalzisternen ein. Die cytoplasmatische freie Ca²⁺-Konzentration erhöht sich von ca. 5×10^{-8} auf ca. 5×10^{-6} M (BAYLOR, CHANDLER & MARSHALL, 1983). In Abhängigkeit von der Anzahl und der Ca²⁺-Affinität der konkurrierenden Bindungsstellen werden die Ca-Ionen auf die verschiedenen Ca²⁺-bindenden Proteine in der Zelle verteilt. Zur Kontraktionsaktivierung ist die Besetzung von Ca²⁺-Bindungsstellen am Regulatorprotein Troponin notwendig. Der Troponinkomplex besteht aus drei Untereinheiten (TN-C, TN-T, TN-I) mit vier Ca²⁺-Bindungsstellen auf dem TN-C Protein. Zwei dieser Bindungsstellen - die "T-sites" - binden spezifisch Ca²⁺. Die beiden anderen Bindungsstellen - die "P-sites" - können neben

Ca^{2+} auch Mg^{2+} binden. Werden die Ca^{2+} -Bindungsstellen mit Ca-Ionen besetzt, so verändert sich die Konformation des Troponinkomplexes. Dieses führt zu einer Verlagerung des Troponomyosinmoleküls auf dem Actinfilament, so daß die Anheftungsstellen für die Myosinköpfe am Actin freigegeben werden. Nach neueren Untersuchungen müssen zur Kontraktionsauslösung möglicherweise nur die "T-sites" des TN-C mit Ca-Ionen besetzt werden (JOHNSON, CHARLTON & POTTER, 1979; JOHNSON, ROBINSON, ROBERTSON, SCHWARTZ & POTTER, 1981; POTTER & GERGELY, 1985; ROSENFELD & TAYLOR, 1985a, b; STRASBURG, LEAVIS & GERGELY, 1985).

Für die Relaxation der Kontraktion ist Parvalbumin, ein weiteres Ca^{2+} -bindendes Protein, von Bedeutung. Parvalbumin besitzt zwei Ca^{2+} -Bindungsstellen, an die wie bei den "P-sites" des TN-C auch Mg-Ionen gebunden werden können. Im Ruhezustand der Zelle sind vorwiegend Mg-Ionen an die Bindungsstellen des Parvalbumins gebunden, da in Ruhe die Mg^{2+} -Konzentration ca. fünf Größenordnungen über der Ca^{2+} -Konzentration liegt. Bei einer Aktivierung steigt die Ca^{2+} -Konzentration in der Zelle innerhalb von wenigen Millisekunden vom Ruhewert auf den Maximalwert. Da jedoch die Geschwindigkeit, mit der die Mg-Ionen von den Bindungsstellen des Parvalbumin abdissoziieren, vergleichsweise niedrig ist zu der Geschwindigkeit, mit der die Ca-Ionen an das TN-C Protein des Troponin anlagern, kommt es zuerst zur Bildung des Ca-Troponin-Komplexes und damit zur Kontraktion (BAYLOR, CHANDLER & MARSHALL, 1983). Vom TN-C Protein aus werden die Ca-Ionen anschließend auf das Parvalbumin umverteilt. Parvalbumin fungiert damit als Zwischenspeicher für die Ca-Ionen vor ihrer Wiederaufnahme in das SR. Dieser Mechanismus ist wahrscheinlich für poikilotherme Tiere, die stark wechselnden Temperaturen ausgesetzt sind, von großer Bedeutung. Hier wird durch die Bindung von Ca-Ionen an Parvalbumin eine rasche Abnahme der freien Ca^{2+} -Konzentration auch bei einer durch niedrige Temperaturen verringerten Pump-Aktivität des SR gewährleistet (GILLIS, THOMASON, LEFÈVRE & KRETSINGER, 1982).

Weitere Ca^{2+} -bindende Proteine in der Zelle sind Myosin und Calmodulin. Außerdem befinden sich auch Ca^{2+} -Bindungsstellen am SR.

Inaktivierung und "restoration" der mechanischen Kraft

Das kontraktile System von Zuckungsfasern der Wirbeltiere kann durch eine passive Depolarisation der Muskelfasermembran aktiviert werden. Wenn diese Depolarisation erheblich länger dauert als das zu einer Zuckung führende Aktionspotential, dann geht die Zuckung in eine über Sekunden anhaltende Kraftentwicklung über, die sogenannte Kontraktur. Verhindert man die Entstehung von Aktionspotentialen durch Tetrodotoxin oder Austausch des extrazellulären Natriums gegen Cholin, so kann eine gradierte Abhängigkeit der Kraftentwicklung vom Membranpotential beobachtet werden. Die grundlegenden Erkenntnisse zur Potentialabhängigkeit der elektromechanischen Kopplung wurden erstmals von HODGKIN und HOROWICZ (1960) beschrieben (Aktivierungskurve). Diese Autoren depolarisierten die Muskelfasern durch eine Erhöhung der extrazellulären K^{+} -Konzentration. Mit der "voltage clamp"-Technik, mit der das Membranpotential einer Muskelzelle genauer und schneller kontrolliert werden kann als durch eine Veränderung der Badlösung, wurden die wesentlichen Befunde zur Potentialabhängigkeit der Kraftentwicklung bestätigt.

Bei einer überschwelligten Aktivierung, z.B. durch eine Depolarisation auf 0 mV, entwickelt die Faser sofort maximale Kraft, erschlafft dann jedoch nach einer Plateaudauer von wenigen Sekunden auf den Ruhespannungswert, auch wenn die Depolarisation der Membran weiter andauert (HODGKIN & HOROWICZ, 1960). Dabei wird mit zunehmender Größe des Depolarisationsschrittes die Plateauphase der Kontraktur verkürzt und die Relaxationsgeschwindigkeit erhöht. Nach einer Kontraktur befindet sich das kontraktile System in einer Art Refraktärstadium, aus dem es erst bei Repolarisation auf ein Potential von mindestens -50 mV langsam wieder zurückkehren kann (repriming, restoration). Die Repolarisation auf Potentiale zwischen -50 und -30 mV führt zu einer nur unvollständigen Wiederherstellung der Kontraktionsfähig-

keit. Nach einer Repolarisation auf weniger negative Potentiale als -30 mV läßt sich keine zweite Kontraktur mehr auflösen. Diese Abhängigkeit der Wiederherstellung der maximalen Kontrakturamplitude von dem Membranpotential wird durch die "steady state restoration"-Kurve ("steady state repriming"-Kurve) beschrieben.

FRANKENHAEUSER und LÄNNERGREN (1967) zeigten, daß die maximale Kontrakturamplitude durch einen depolarisierenden Vorpuls (konditionierende Depolarisation) verringert werden kann. Trägt man die veränderte Kontrakturamplitude in Abhängigkeit vom Potential der konditionierenden Vordepolarisation auf, so erhält man bei einer hinreichend langen Dauer der Vorpulse die "steady state"-Inaktivierungskurve. Da in der Regel die Versuche an mehreren Fasern mit unterschiedlichem Durchmesser durchgeführt werden, gibt man die Kontraktionshöhe in Prozent der für die betreffende Faser maximalen möglichen Kraft an. Die Inaktivierungskurve verläuft bei normaler extrazellulärer Ca^{2+} -Konzentration spiegelbildlich zu der S-förmigen Aktivierungskurve.

HODGKIN und HOROWICZ (1960) entwickelten ein erstes Modell zur Erklärung der spontanen Relaxation einer Muskelfaser bei andauernder Depolarisation der Zellmembran. Dieses Modell beschreibt auch den bei Repolarisation einsetzenden "repriming"-Prozeß. Nach Vorstellung der Autoren wird die Relaxation der Faser durch die Verringerung der Konzentration eines Aktivators verursacht. Dieser Aktivator wird potentialabhängig bei Depolarisation freigesetzt. Gleichzeitig mit der Ausschüttung setzt jedoch auch der Abbau des Aktivators ein. Größere Depolarisationsschritte führen zu einer Beschleunigung der Freisetzung und des Abbaus, so daß die Gesamtmenge der verfügbaren Aktivatorsubstanz entsprechend früher abnimmt. Somit kann auch die Abhängigkeit von Plateaudauer und Relaxationsphase der Kontraktur von der Größe des Depolarisationsschrittes erklärt werden. Die Wiederherstellung der Kontraktilität bei Repolarisation wird verursacht durch eine Zurückführung des Aktivatormoleküls in den ursprünglichen Zustand, aus dem es bei Depolarisation schnell wieder freigesetzt werden kann. HODGKIN und HOROWICZ sowie weitere Autoren

sahen jedoch auch noch eine alternative Erklärung für die spontane Relaxation der Kraft und den bei Repolarisation einsetzenden "repriming"-Prozeß. So besteht die Möglichkeit, daß bei länger andauernder Depolarisation einer Muskelfaser der für die Ca^{2+} -Freisetzung verantwortliche Mechanismus inaktiviert und erst während einer Repolarisation wieder funktionsfähig wird (HODGKIN & HOROWICZ, 1960; LÜTTGAU, 1963; CAPUTO, 1972).

Die ersten Untersuchungen durch SCHNEIDER und CHANDLER (1973) zur Kinetik der "charge movement" in der T-Tubulummembran sowie weiterführende Experimente anderer Autoren sprachen dafür, daß den intramembranaln Ladungen auch eine entscheidende Funktion bei der Inaktivierung des kontraktile Systems zugeordnet werden kann. So gehen auch die Ladungsträger bei länger dauernder Depolarisation in einen refraktären Zustand über; sie werden immobilisiert (CHANDLER et al., 1976b; RAKOWSKI, 1981). Dieser Prozeß setzt mit der gleichen Geschwindigkeit ein, mit der eine unter denselben Bedingungen ausgelöste Kontraktur inaktiviert. Dies führte zu der Vorstellung, daß eine Veränderung im spannungsabhängigen Kopplungs-Schritt für die Inaktivierung der Kraft verantwortlich ist. Die Immobilisierung der Ladungsträger kann durch eine ausreichend lange und starke Repolarisation wieder rückgängig gemacht werden (ADRIAN, CHANDLER & RAKOWSKI, 1976; ADRIAN & RAKOWSKI, 1978). In gleicher Weise ist auch die Wiederherstellung der mechanischen Kraft nach einer Inaktivierung von Dauer und Größe der Hyperpolarisation abhängig (HODGKIN & HOROWICZ, 1960; HEISTRACHER & HUNT, 1969; vgl. 3.6.3).

In der Abbildung 1.1 ist dargestellt, wie das "charge movement"-Modell mit diesen Experimenten in Einklang gebracht wurde. Nach CHANDLER und Mitarbeitern (1976b) werden die Ladungsbewegungen in der T-Tubulummembran bei einer Aktivierung von schnell beweglichen positiven Ladungen verursacht und bei einer Inaktivierung aus verzögert reagierenden negativen Ladungen. Die positiven Ladungen verschieben sich bei Depolarisation schnell von der dem SR zugewandten Seite der T-Tubulummembran an die gegenüberliegende Seite und öffnen

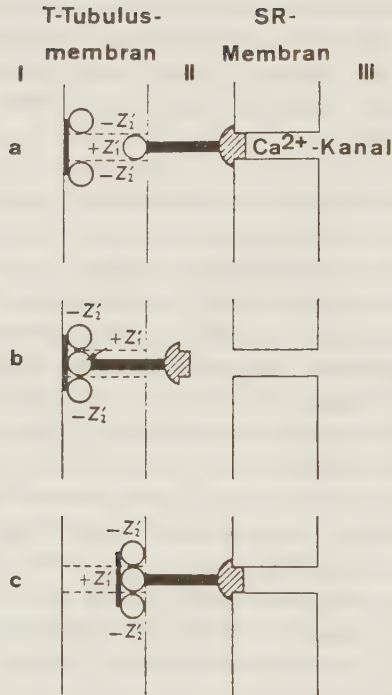


Abb. 1.1 Das "charge movement"-Modell von CHANDLER, RAKOWSKI und SCHNEIDER (1976b)

Die ausführliche Beschreibung des Modells befindet sich im Text
 I = Lumen des T-Tubulus
 II = junctional gap
 III = Terminalzisterne des SR
 $+Z_1$ = positiv geladenes Molekül
 $-Z_2$ = negativ geladenes Molekül

a = Ruhezustand der Muskelfaser
 b = aktivierter Zustand
 c = Refraktärstadium

dabei die Ca^{2+} -Kanäle am SR. Die negativ geladenen Moleküle bewegen sich langsam in die entgegengesetzte Richtung, bringen damit die positiven Ladungen wieder in ihre Ausgangsposition und unterbrechen so die Ca^{2+} -Freisetzung. Bei einer Repolarisation zur Wiederherstellung der Kraft verschieben sich die negativen Ladungen wieder an ihren ursprünglichen Ort, d.h. an die dem Extrazellulärraum zugewandte Seite der T-Tubulummembran. Auf der Basis des "charge movement"-Modells wurden in den letzten Jahren zwei weiterführende Theorien zur Inaktivierung der mechanischen Kraft entwickelt, bei denen den Ca-Ionen eine wichtige Rolle zukommt.

EISENBERG, McCARTHY und MILTON (1983) zeigten an Froschskellettmuskelfasern, daß bei niedrigen Versuchstemperaturen (5 bis 7 °C) in Gegenwart des Ca-Antagonisten D600 nur eine "normale" K^{+} -Kontraktur ausgelöst werden kann. Erneute Depolarisationen führen zu keiner Kraftentwicklung der Faser. Zu diesem Zeitpunkt lassen sich bei einer Depolarisation auch keine intramembranaln Ladungsbewegungen mehr nachweisen (HUI, MILTON & EISENBERG, 1983). Allerdings können durch Coffein, welches Ca-Ionen direkt aus dem SR freisetzt, weiterhin Kontrakturen induziert werden. Dies ist ein Hinweis darauf, daß durch D600 ein Prozeß blockiert wird, der zeitlich gesehen in der elektromechanischen Kopplung vor der Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR liegt. Auf Grund dieser Experimente wird angenommen, daß in der T-SR-Kopplung nach dem Stadium der Inaktivierung noch ein zweiter inaktivierter Zustand existiert (paralysed state, EISENBERG et al., 1983). Aus dem inaktivierten Zustand kann das kontraktile System innerhalb von Sekunden bis Minuten zurückkehren. Aus dem Stadium "paralysed" ist eine Rückkehr nicht mehr möglich oder erst nach einer längeren Erholungsdauer unter besonderen Versuchsbedingungen (z.B. Erhöhung der Versuchstemperatur, EISENBERG et al., 1983; starke Hyperpolarisation, GOTTSCHALK & LÜTTGAU, 1985).

Nach Experimenten von GRAF und SCHATZMANN (1984) wirkt der Entzug der extrazellulären Ca-Ionen ähnlich paralysierend auf die elektromechanische Kopplung wie die Zugabe von D600. Die Autoren entwickelten aufgrund ihrer Experimente ein Modell,

in dem Ca-Ionen Bestandteil des geladenen Molekülkomplexes sind, der in der T-Tubulusmembran als Spannungssensor wirkt. GRAF und SCHATZMANN nehmen an, daß unter ihren Versuchsbedingungen die Ca-Ionen aus dem Molekülkomplex bei Depolarisation in den Extrazellulärraum abdissoziieren. Nach den Vorstellungen der Autoren würde dadurch die Kopplungsstruktur ihre Spannungsempfindlichkeit verlieren (ausf. Beschreibung dieses Modells in 4.1.3 und Abb. 4.1).

Der Einfluß der extrazellulären Ca^{2+} -Ionen auf die Kontraktilität der Muskelfaser

Inaktivierungs- und "repriming"-Kurve zeigen eine ausgeprägte Abhängigkeit von der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Die Aktivierungskurve wird dagegen nicht oder nur sehr wenig durch Versuchslösungen beeinflusst, in denen die Ca^{2+} -Konzentration durch eine äquivalente Mg^{2+} -Konzentration substituiert ist (CAPUTO & GIMINEZ, 1967; FRANKENHAEUSER & LÄNNERGREN, 1967; LÜTTGAU & SPIECKER, 1979; COTA & STEFANI, 1982). Eine Verringerung des extrazellulären Calciums verschiebt Inaktivierungs- und "repriming"-Kurve in Richtung negativerer Potentiale. Eine Erhöhung der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration hat den entgegengesetzten Effekt.

Der unterschiedliche Einfluß des extrazellulären Calciums auf Aktivierungs- und Inaktivierungskurve kommt auch im Verlauf der Kontraktur zum Ausdruck. So verkürzen sich bei Entzug des extrazellulären Calciums Amplitude und Plateau der Kontraktur, während die Anstiegssteilheit gleich bleibt. Es ist anzunehmen, daß der Ca^{2+} -Entzug zu einer Beschleunigung der Inaktivierungskinetik bei unveränderter Geschwindigkeit des Aktivierungsvorgangs führt (TAKAUJI & NAGAI, 1977; SPIECKER, 1980).

Ein Entzug des extrazellulären Calciums, ohne gleichzeitige Substitution durch die 1,5- bis 2-fache Mg^{2+} -Konzentration, beeinflusst die Oberflächenladungen der Zellmembran (STEFANI & CHIARANDINI, 1973; DÖRRSCHEIDT-KÄFER & PUSCH, 1975; DÖRRSCHEIDT-KÄFER, 1976). Nach einem Modell von HILLE, WOODHULL und SHAPIRO (1975) ist die Oberfläche der Zellmem-

bran mit vorwiegend negativen Festladungen besetzt, die teilweise von Kationen abgeschirmt oder durch Bindung neutralisiert werden. Bei Entzug des extrazellulären Calciums vermindert sich die Abschirmung der negativen Festladungen. Dies führt zu einer Abflachung des Potentialgefälles innerhalb der Membran. Dadurch werden die in der Membran ablaufenden potentialabhängigen Vorgänge ähnlich beeinflusst wie durch eine Depolarisation. Verschiedene Autoren fanden in Ca^{2+} -armen Lösungen, in denen Calcium nicht durch Magnesium ersetzt worden war, eine Verschiebung der Aktivierungs- und Inaktivierungskurve zu negativeren Potentialen (LÜTTGAU, 1963; FRANKENHAEUSER & LÄNNERGREN, 1967). Wird dagegen der Versuchslösung in ausreichender Konzentration Magnesium zugesetzt und damit vermieden, daß durch den Entzug des Calciums die Zahl der freien negativen Oberflächenladungen an der Außenseite der Zellmembran zunimmt, dann verändert sich die Lage der Aktivierungskurve nicht. Die Inaktivierungskurve wird jedoch unter diesen Versuchsbedingungen weiterhin zu negativeren Potentialen verschoben (LÜTTGAU & SPIECKER, 1979). Es kann also angenommen werden, daß der Entzug des extrazellulären Calciums eine spezifische Wirkung nur auf den Inaktivierungsprozeß hat.

Eine ähnliche Verschiebung wie durch Entzug des extrazellulären Calciums läßt sich auch durch die Verwendung von Dantrolen erzielen, das die freie Ruhe- Ca^{2+} -Konzentration in der Zelle herabsetzt (DESMEDT & HAINAUT, 1977; TAKAUJI & NAGAI, 1977). Coffein, das dagegen die freie Ruhe- Ca^{2+} -Konzentration erhöht, verschiebt die Inaktivierungskurve zu positiveren Potentialen (LÜTTGAU & OETLIKER, 1968). Die Annahme ist daher naheliegend, daß ein Entzug des extrazellulären Calciums auch die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration verringert und die Verschiebungen der Inaktivierungskurve in Ca^{2+} -freien Lösungen auf eine erniedrigte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration zurückzuführen sind. Es ist in diesem Zusammenhang von Interesse, daß bei Messungen mit Ca^{2+} -sensitiven Elektroden tatsächlich eine Herabsetzung der freien intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration von $1,2 \times 10^{-7}$ M in Ringer auf 4×10^{-8} M in Ca^{2+} -freier Versuchslösung festgestellt wurde (LÓPEZ, ALAMO, CAPUTO, DIPOLLO & VERGARA, 1983).

Ausblick auf die vorliegende Arbeit

Die bislang veröffentlichten Untersuchungen sprechen für eine Schlüsselfunktion von Ca-Ionen in dem Inaktivierungsprozeß. Mit den Experimenten der vorliegenden Arbeit wurde erstmals eingehend der Einfluß von extrazellulärer und intrazellulärer Ca^{2+} -Konzentration auf den Inaktivierungsprozeß untersucht. Durch die Anwendung der "voltage clamp"-Technik konnte - anders als in den Untersuchungen vieler Autoren mit K^{+} -Kontrakturen - eine schnelle Änderung des Membranpotentials auch in hyperpolarisierender Richtung erzielt werden.

Die Versuchsergebnisse deuten darauf hin, daß die Verschiebung der Inaktivierungskurve in Ca^{2+} -freier Versuchslösung nicht unmittelbar auf den Entzug des extrazellulären Calciums zurückzuführen ist. Als direkte Ursache kommt eine Verringerung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in Frage.

Das bislang favorisierte "charge movement"-Modell von CHANDLER et al. (1976a), das drei Zustandsformen des potentiellen Kopplungsgliedes der elektromechanischen Kopplung fordert (ruhend, aktiviert, inaktiviert), reicht zur Diskussion der Ergebnisse nicht aus. Es muß um mindestens einen zusätzlichen inaktivierten Zustand erweitert werden.

2. M A T E R I A L U N D M E T H O D E N

2.1 Präparate

Die Experimente wurden an den Fasern des Musculus lumbricalis longissimus digiti IV (ECKER, 1896) der Hinterbeine des braunen Grasfrosches (Rana temporaria) durchgeführt. Die Zehenmuskelfasern eignen sich sehr gut für die verwendete Punkt-"voltage clamp"-Methode, da sie bei einem Durchmesser von ca. 70 μm nur etwa 1,1 bis 1,5 mm lang sind. Wird die stromzuführende Mikroelektrode ungefähr in die Mitte der Faser eingestochen und der Membranwiderstand durch Zugabe entsprechender extrazellulärer Lösungen (siehe 2.2.1) erhöht, so kann bei diesen kurzen Muskelfasern über die gesamte Muskelfasermembran ein einheitliches Membranpotential eingestellt werden (GOTTSCHALK, 1979, 1984; BERWE & FELDMEYER, 1984). Die herauspräparierten Muskeln wurden zuerst vorsichtig vom Bindegewebe befreit und der Länge nach aufgeschnitten. Für das endgültige Präparat wurden dann kleine Abschnitte mit etwa 20 bis 30 parallel verlaufenden Fasern herausgetrennt (vgl. GOTTSCHALK, 1979).

2.2 Versuchsanordnung und -auswertung

2.2.1 Versuchsaufbau

Nach der Präparation wurde das Muskelpräparat an einer Seite auf einem Blöckchen aus Silikonharz (Sylgard 184, Dow corning) mit feinen Nadeln festgesteckt und zusammen mit dem Blöckchen in die Versuchskammer überführt. In dieser befand sich bereits die auf Versuchstemperatur vorgekühlte Ringer-Lösung. Das Silikonharzblöckchen wurde in der Kammer festgesteckt. Das nicht befestigte Ende des Präparates wurde in einen mechano-elektrischen Transducer (Endevco, Modell 8107-2), der Teil einer "Wheatstone"-Gleichspannungsbrückenschaltung war, eingehängt.

Bei Kontraktionsmessungen ist es notwendig, daß alle Sarkomere nahezu gleichzeitig und gleich stark aktiviert werden. Dazu muß eine möglichst uniforme Depolarisation der gesamten Fasermembran erzielt werden. Diese Bedingung läßt sich durch eine Erhöhung des Membranwiderstandes und eine damit große Längenkonstante weitgehend erfüllen. Deshalb wurden alle "voltage clamp"-Experimente in TEA-Sulfat-Lösung (Lösung E, F oder G) durchgeführt. In dieser Lösung sind die permeablen Chloridionen durch impermeable Sulfationen ersetzt, die Leitfähigkeit der Membran für Kaliumionen ist durch Tetraethylammonium und die für Natriumionen durch Tetrodotoxin blockiert. Durch diese Maßnahme wurde selbst im Potentialbereich der normalen Aktivierung von Kaliumionenströmen eine weitgehend einheitliche Polarisation der Membran gewährleistet. Der TEA-Sulfat-Lösung wurde gegebenenfalls das zu untersuchende Pharmakon beigefügt. Der Lösungswechsel von der Ringer- auf die TEA-Sulfat-Lösung erfolgte in zwei Schritten. Zuerst wurde die Badlösung gegen eine vorgekühlte Sulfat-Ringer-Lösung ausgetauscht (Lsg. C oder D). Der Entzug der extrazellulären Chloridionen führte zu einer vorübergehenden Depolarisation der Membran und damit in den meisten Fällen zu einer phasischen Kontraktur. Nach etwa 5 Minuten hatten die Präparate jedoch wieder ihre Ruhespannung erreicht. Erst dann wurde die vorgekühlte TEA-Sulfat-Lösung zugegeben. In einigen Fällen traten auch hierbei Kontrakturen auf. Nach Beendigung dieser Kontrakturen, frühestens jedoch nach 5 Minuten, wurde mit den Experimenten begonnen. Die verwendete "voltage clamp"-Apparatur entsprach in den wesentlichen Teilen der bei GOTTSCHALK 1979 und 1984 beschriebenen Anlage. Der prinzipielle Aufbau beruht auf der Punkt-"voltage clamp"-Methode von COSTANTIN (1968). Das Membranpotential wurde intrazellulär mit konventionellen Glas-Mikroelektroden gemessen, die mit 3-molarer Kaliumchloridlösung gefüllt waren. Die Glas-Mikroelektroden für die Stromzuführung enthielten eine 2-molare Kaliumcitratlösung. Die Widerstände der Elektroden lagen zwischen 8 und 20 M Ω , die Tipspotentiale bei den Spannungselektroden unter 10 mV. In allen Experimenten wurden flexible Elektroden verwendet. Dadurch konnten sich die Elektroden bei den meist sehr starken Kontraktionen der Muskelfasern mitbewegen, ohne dabei die Kontraktion zu beein-

flussen. Die Herstellung der flexiblen Elektroden ist in der Diplomarbeit von GOTTSCHALK (1979) ausführlich beschrieben. Vor dem Einstich wurde das Tippotential der Spannungselektrode auf 0 mV abgeglichen. Der Einstich selbst konnte dann über Spannungsmeßinstrumente, die das Membranpotential anzeigten, kontrolliert werden. Die Temperatur wurde während der Experimente mit einem Thermistor überprüft. Die meisten Experimente wurden - sofern nicht anders angegeben - bei 7 °C durchgeführt. Alle Experimente wurden mit einem Tonbandgerät (Racal Recorders, store 4 D) registriert und gleichzeitig auf einem Digitaloszilloskop (Tektronix, 5D10 Waveform Digitizer) dargestellt. Die auf dem Digitaloszilloskop aufgezeichneten Kontraktionen konnten sofort nach Beendigung des jeweiligen Experimentes bezüglich Amplitude, Dauer und Anstiegssteilheit ausgewertet und anschließend abfotografiert werden. In Abbildung 2.1 ist die typische Aufzeichnung eines Experimentes dargestellt.

2.2.2 Messung und Auswertung der mechanischen Inaktivierung

Die Inaktivierungskurve beschreibt den Einfluß des Membranpotentials auf die Amplitude der durch Depolarisation einer Muskelfaser ausgelösten phasischen Kraftentwicklung (Abb. 2.2). HODGKIN und HOROWICZ (1960) untersuchten zum erstenmal die Potentialabhängigkeit der mechanischen Inaktivierung. Sie fanden eine sigmoide Beziehung zwischen Kontrakturamplitude und Membranpotential, mit maximaler Kraftentwicklung bei Werten negativer als -50mV und fehlender Kraftentwicklung bei Werten weniger negativ als -20 mV. Bei meinen Experimenten wurde die Potentialabhängigkeit der Inaktivierung wie folgt gemessen: Die Muskelfasern wurden für eine Minute auf das zu untersuchende Potential depolarisiert. Danach wurde durch eine Depolarisation auf 0 mV die verbliebene Kontraktilität bestimmt. Aus der Höhe dieser Kontraktur - normiert auf eine vorher aufgenommene Kontrolle - kann man auf den Inaktivierungsgrad durch den konditionierenden Vorpuls zurückschließen (FRANKENHAEUSER & LÄNNERGREN, 1967). Die Kontrollkontraktionen wurden durch eine 20 Sekunden dauernde Depolarisation von -90 mV auf ein Membranpotential von 0 mV bestimmt (Abb. 2.3).

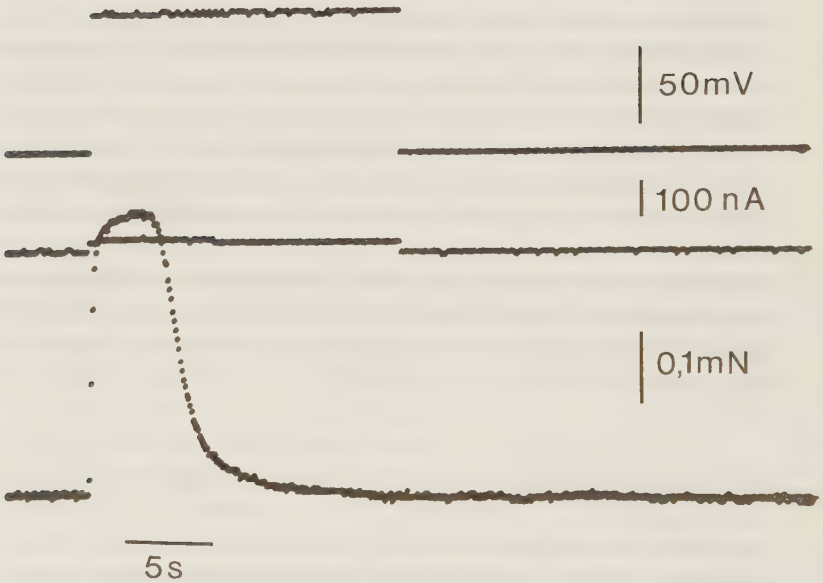


Abb. 2.1 Kontraktionsaktivierung und -inaktivierung in einem "voltage clamp"-Experiment

Die Abbildung zeigt eine typische Kontraktur, die durch Depolarisation einer Skelettmuskelfaser von -90 mV auf 0 mV ausgelöst wurde. Nach ungefähr 5 Sekunden (temperaturabhängig) erschlaffte die Faser, obwohl das Membranpotential weiterhin auf 0 mV depolarisiert blieb. Dieses und alle weiteren abgebildeten Experimente wurden digital aufgezeichnet. Auf der untersten Spur der Darstellungen ist stets die Kraftentwicklung abgebildet. Die mittlere Spur zeigt den Membranstrom während der Depolarisation und die obere Spur das Membranpotential.

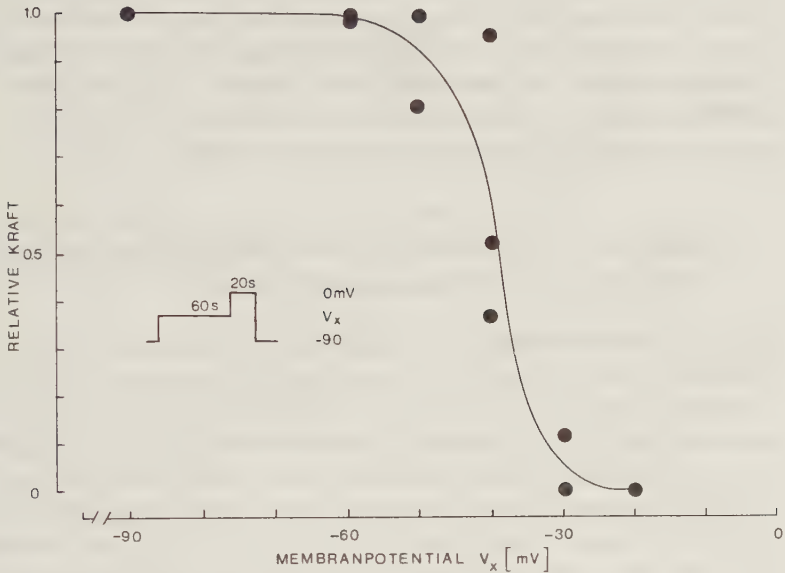


Abb. 2.2 Inaktivierungskurve

Die Inaktivierungskurve beschreibt die Abhängigkeit der Kontrakturamplitude (Ordinate, relative Kraft) von dem Potential eines konditionierenden Vorpulses (Abszisse, Membranpotential V). Das links unten in die Abbildung eingefügte Schema veranschaulicht den Versuchsablauf. Die jeweils nach dem inaktivierenden Vorpuls bei maximaler Aktivierung noch verbliebene Kraftentwicklung wurde stets auf eine zuvor ausgelöste Kontrollkontraktur normiert. Die einzelnen Meßwerte der dargestellten Inaktivierungskurve wurden an vier verschiedenen Muskelfasern bei 6,5 bis 7 °C in Lösung E aufgenommen. Die Inaktivierungskurve wurde nach Augenmaß unter Berücksichtigung aller Meßwerte gezeichnet. Weitere Angaben zur Versuchsdurchführung sind dem Text in 2.2.2 zu entnehmen.

Bei der Auswertung der Ergebnisse wurden nur Experimente berücksichtigt, bei denen die Höhe der Kontrollkontraktur während der Gesamtdauer des Versuches weitgehend konstant blieb. Zwischen zwei Aktivierungen wurde stets eine 5-minütige Ruhephase bei einem Membranpotential von -90 mV eingehalten. Dadurch sollten kumulative Effekte, wie z.B. eine erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration durch die vorhergehende Aktivierung, verhindert werden.

2.2.3 Messung und Auswertung der Wiederherstellung der Kraft nach einer vollständigen Inaktivierung

Eine weitere Möglichkeit zur Untersuchung des Inaktivierungsprozesses bilden Experimente zur Wiederherstellung der Kontraktionsfähigkeit nach einer Inaktivierung (repriming, restoration). Dazu wurde die Faser für 3 Minuten von -90 mV auf 0 mV depolarisiert. Die Faser entwickelte dabei maximale Kraft, erschlaffte jedoch spontan nach 5 bis 10 Sekunden (Inaktivierung). Nach Beendigung des Pulses wurde die Faser für eine bestimmte Zeit auf das zu untersuchende Potential repolarisiert. Danach wurde durch eine erneute Depolarisation auf 0 mV das Ausmaß der "restoration" gemessen (Abb. 2.4). Die Auftragung der auf eine Kontrolle normierten Höhe der zweiten Kontraktur in Abhängigkeit vom vorher angelegten Membranpotential führte zur sogenannten "restoration curve". Als Kontrolle für die zweite Kontraktur diente in meinen Experimenten jeweils die Kraft, die bei der maximalen Aktivierung zu Beginn des Experimentes entwickelt wurde. Die Differenz zwischen Kontrollkontraktur und zweiter Kontraktur erlaubte - im gewissen Rahmen (siehe Diskussion) - Aussagen über die Abhängigkeit der "restoration" von der Dauer des "repriming"-Pulses ("restoration"-Zeitkurve) und von dem Potential des "repriming"-Pulses ("steady state restoration"-Kurve). Dafür war jedoch Voraussetzung, daß die jeweilige Faser vor Beginn des "repriming"-Prozesses vollständig inaktiviert war. Für diesen Zweck depolarisierten HODGKIN und HOROWICZ (1960) die Muskelfasermembran für eine Minute auf 0 mV. Vermutlich ist jedoch nach einer Minute im Inaktivie-

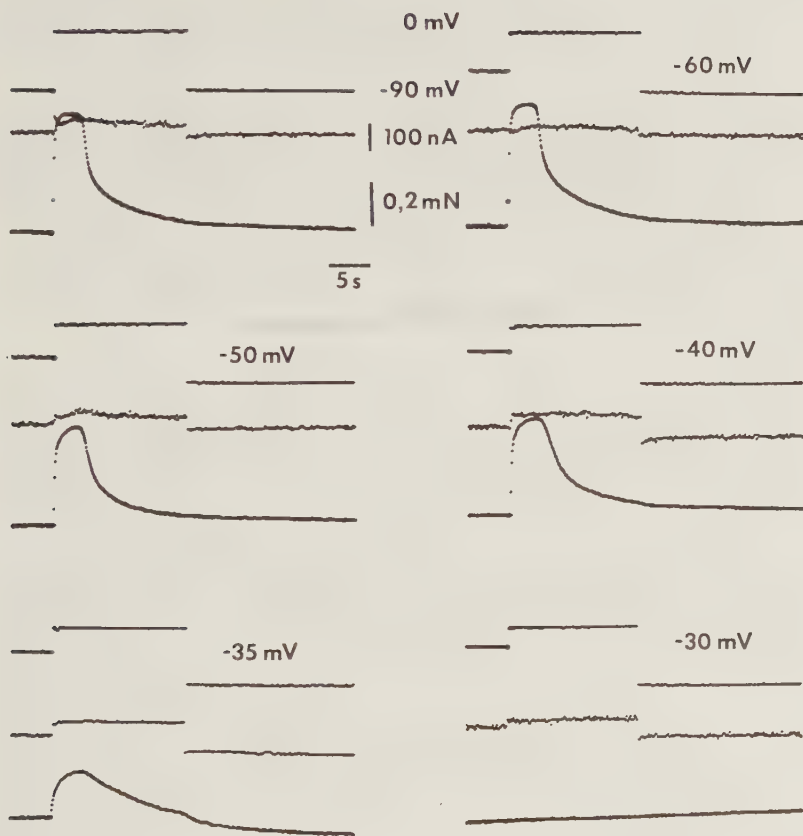


Abb. 2.3 Inaktivierung im "voltage clamp"-Experiment

Das Experiment wurde nach der Methode von FRANKENHAEUSER und LÄNNERGREN (s.o.) an einer Muskelfaser in Lösung E bei 6,5 °C durchgeführt. In der ersten Abbildung ist die Kontrollkontraktur dargestellt, die weiteren Abbildungen zeigen die Abhängigkeit der Kraftentwicklung von dem Potential des konditionierenden Vorpulses (Dauer 1 min). In der vorliegenden und in weiteren Abbildungen dieser Arbeit veränderte sich in einigen Fällen der Ruhespannungswert nach Beendigung des Pulses. Wahrscheinlich ist dies auf eine Umlagerung des Präparates - verursacht durch die vorangegangene Kontraktur - zurückzuführen.

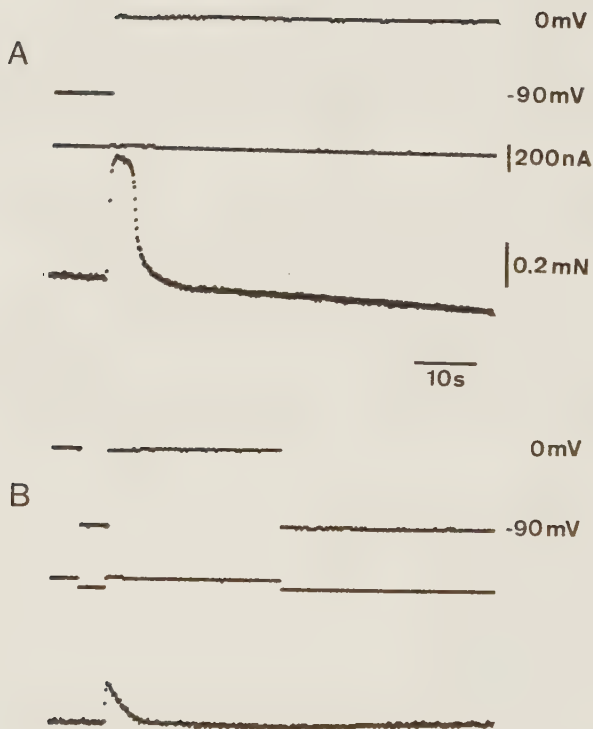


Abb. 2.4 Die Wiederherstellung der Kontraktionsfähigkeit nach einer vollständigen Inaktivierung

Die Muskelfaser wurde für 3 Minuten auf einem Membranpotential von 0 mV inaktiviert. Durch die Depolarisation von -90 auf 0 mV wurde eine Kontraktur ausgelöst, die nach ungefähr 3 Sekunden spontan inaktivierte (A). Nach 3 Minuten wurde die Faser für 5 Sekunden auf -90 mV repolarisiert. Eine sofort darauf folgende erneute Depolarisation auf 0 mV zeigte, daß die maximale Kontraktionsfähigkeit der Faser zu 36 % wiederhergestellt war (B). Das Experiment wurde bei 12°C in Lösung E durchgeführt.

rungsverlauf noch kein stationärer Zustand erreicht, da die einzelnen Meßwerte meiner "repriming"-Experimente nach 1-minütiger Inaktivierungsdauer sehr stark variierten. Erst durch eine Verlängerung der Depolarisationszeit auf 3 Minuten konnten einheitlichere Versuchsergebnisse erzielt werden.

Zwischen den einzelnen "repriming"-Experimenten wurde wie bei den Inaktivierungsversuchen stets eine 5-minütige Wartezeit bei einem Membranpotential von -90 mV eingehalten. Bei der Auswertung wurden nur Meßwerte berücksichtigt, die durch weitgehend gleichbleibende Amplituden der Kontrollkontraktionen während der gesamten Versuchsdauer abgesichert waren.

2.3 Lösungen und Substanzen

2.3.1 Zusammensetzung der wichtigsten Versuchslösungen

Die Experimente wurden in folgenden Lösungen durchgeführt:

Lösung A: Standard-Ringer-Lösung (ADRIAN, 1956)

NaCl: 115; KCl: 2,5; Na_2HPO_4 : 2,15; NaH_2PO_4 : 0,85; CaCl_2 : 1,8 (alle Angaben in mM). In der Standard-Ringer-Lösung wurden die Muskeln normalerweise aufbewahrt, präpariert und in die Versuchskammer eingespannt.

Lösung B: Standard-Ringer-Lösung ohne Calcium

NaCl: 115; KCl: 2,5; Na_2HPO_4 : 2,15; NaH_2PO_4 : 0,85; MgCl_2 : 3,24 (alle Angaben in mM). In dieser Lösung wurden die Präparate für die Versuche mit Ca^{2+} -freien Lösungen und Quin-2 gespült und in die Versuchskammer eingespannt.

Lösung C: Sulfat - Ringer-Lösung (HODGKIN & HOROWICZ, 1959)

K_2SO_4 : 1,25; Na_2SO_4 : 38,75; Na_2HPO_4 : 1,08; NaH_2PO_4 : 0,43; Saccharose: 113; Ca_2SO_4 : ~ 9,4 (alle Angaben in mM) und TTX*: 10^{-7} g/ml.

Lösung D: Sulfat-Ringer-Lösung ohne Calcium

K_2SO_4 : 1,25; Na_2SO_4 : 38,75; Na_2HPO_4 : 1,08; NaH_2PO_4 : 0,43;
 $MgSO_4$: 17,4; Saccharose: 101 (alle Angaben in mM) und TTX:
 10^{-7} g/ml.

Lösung E: Tetraethylammonium-(TEA-)Lösung (NICOLA SIRI, SANCHEZ & STEFANI, 1980)

K_2SO_4 : 1,25; $(TEA)_2SO_4$: 40; MOPS^o: 5; Saccharose: 113;
 $CaSO_4$: ~9,4 (alle Angaben in mM) und TTX: 10^{-7} g/ml.

Lösung F: TEA-Lösung ohne Calcium

K_2SO_4 : 1,25; $(TEA)_2SO_4$: 40; MOPS: 5; Saccharose: 101; $MgSO_4$:
17,4; EGTA^o: 1 (alle Angaben in mM) und TTX: 10^{-7} g/ml.

Lösung G: TEA-Lösung zur Stoffwechselvergiftung

K_2SO_4 : 1,25; $(TEA)_2SO_4$: 40; MOPS: 5; Saccharose: 113; $CaSO_4$:
7,9-8,2; IAA[•]: 1-2; NaCN: 2 (alle Angaben in mM) und TTX:
 10^{-7} g/ml.

TTX* = Tetrodotoxin

MOPS^o = 3-(N-Morpholino)propan-Sulfonsäure

EGTA^o = Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)N,N-tetraessig-
säure

IAA[•] = Monojodessigsäure

Alle Lösungen wurden auf pH 7,0 eingestellt. In den Lösungen C und E wurde die freie Calciumkonzentration mit einer Ca^{2+} -sensitiven Elektrode bestimmt. Sie betrug etwa 4 mM.

2.3.2 Die Herstellung der Dantrolenlösung

Dantrolen Natrium (1-[5-(p-Nitrophenyl)-furfuryliden-amino]-imidazolidin-2,4 dion Natriumsalz) wurde 1967 von SNYDER und Mitarbeitern synthetisiert. Neuerdings findet es unter dem Namen Dantrium pharmakologische Verwendung bei der Behandlung von Spasmen unterschiedlichen Ursprungs (ELLIS & BRYANT, 1972; ELLIS & CARPENTER, 1972; PUTNEY & BIANCHI, 1974). Dantrolen Natrium wurde in Pulverform bei der Firma Röhm Pharma, Weiterstadt, bezogen. Es erwies sich als sehr

schlecht löslich. Auch eine Erhöhung des pH-Wertes, die laut Angabe des Herstellers die Löslichkeit wesentlich erhöhen sollte, führte nur zu unwesentlichen Verbesserungen. In TEA-Lösung (Lsg. E) und Ringer-Lösung (Lsg. A) konnte somit nur eine maximale Dantrolenkonzentration von 25 μM erreicht werden. Die Lösung mußte am jeweiligen Versuchstag kurz vor Beginn der Experimente frisch angesetzt werden, da Dantrolen lichtempfindlich ist und in Lösung nur maximal 6 Stunden haltbar ist (Angabe des Herstellers). Dantrolen wurde direkt in die Lösungen eingewogen. Nach einer Inkubationsdauer von 10 Minuten wurde mit den Experimenten begonnen.

2.3.3 Die Herstellung Ca^{2+} -freier Lösungen

Durch Versuchslösungen mit einer möglichst niedrigen Konzentration an freiem Calcium sollte eine Umkehrung oder Aufhebung des elektrochemischen Gradienten für Ca^{2+} -Ionen an der Membran herbeigeführt werden. Da der Entzug zweiwertiger Kationen das Oberflächenpotential der Membran erhöht (DÖRRSCHEIDT-KÄFER & PUSCH, 1975; DÖRRSCHEIDT-KÄFER, 1976) und die Labilität der Membranstruktur vergrößert (DE MELLO, 1973), wurde das entzogene Calcium durch Magnesium substituiert. Der Einfluß von Magnesium auf die Oberflächenladungen ist jedoch kleiner als der des Calciums ($2 \text{ Mg}^{2+} \triangleq 1 \text{ Ca}^{2+}$, DÖRRSCHEIDT-KÄFER, 1976; $1,5 \text{ Mg}^{2+} \triangleq 1 \text{ Ca}^{2+}$, STEFANI & CHIARANDINI, 1973). Aus diesem Grunde wurde in den Lösungen B, D und F die freie Calciumkonzentration von 1,8 bzw. 4 mM durch eine 1,8-fach höhere freie Magnesiumkonzentration substituiert (Mittelwert aus DÖRRSCHEIDT-KÄFER, 1976, und STEFANI & CHIARANDINI, 1973), d.h. durch 3,24 bzw. 7 mM Magnesium. Da die Lösungen D und F für "voltage clamp"-Experimente benutzt werden sollten, mußte Sulfat als Anion beibehalten werden (siehe 2.2.1). Sulfat bildet jedoch Komplexe mit Magnesium, so daß die freie Magnesiumkonzentration verringert wird. Unter Berücksichtigung dieses Umstandes wurde eine Magnesiumsulfatkonzentration von 17,4 mM in Lösung D und F berechnet. Die ausführliche Beschreibung der Berechnung und Herstellung von Lösungen mit definiertem niedrigen Calciumgehalt findet sich bei SPIECKER (1976, 1980).

Um die Ca^{2+} -Restkonzentration durch Verunreinigung bzw. durch aus verletzten Zellen ausströmendes Calcium möglichst niedrig zu halten, wurde in Lösung F zusätzlich 1 mM des Ca^{2+} -Chelators EGTA (Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)N,N'-tetraessigsäure) hinzugegeben. EGTA besitzt den Vorteil einer größeren Affinität für Calcium als für Magnesium. Nach den Berechnungen von SPIECKER (1980) ist für Versuchslösungen mit niedrigem Ca^{2+} -Gehalt eine freie Ca^{2+} -Konzentration von 10^{-8} bis 10^{-9} M anzunehmen.

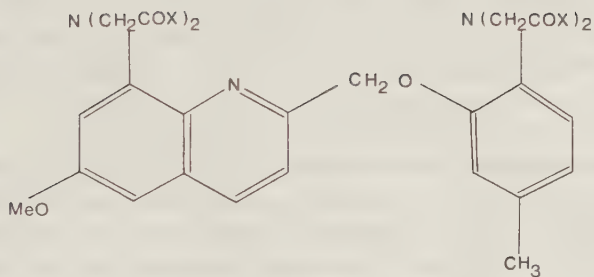
SCHARFF (1979) konnte zeigen, daß die berechnete freie Ca^{2+} -Konzentration eines EGTA-Puffergemisches gut mit der Konzentration übereinstimmt, die mit einer Ca^{2+} -sensitiven Glaselektrode gemessen wird.

2.3.4 Der Wirkungsmechanismus von Quin-2

R.Y. Tsien gelang die Synthese einer neuen Gruppe von Ca^{2+} -Chelatoren, die eine Herabsetzung und gleichzeitig auch eine Messung der freien intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration an intakten Fasern ermöglicht (zusammenfassend in TSIEN, 1983). Einer der interessantesten Vertreter dieser Gruppe ist Quin-2, ein Tetracarboxylatchelator, der sich in seiner Grundstruktur auf das EGTA zurückführen läßt (Abb. 2.5). Aus diesem Grunde besitzt Quin-2 eine Reihe von Eigenschaften des EGTA:

- hohe Affinität für Ca^{2+} ($K_d = 115 \times 10^{-9}$ M)
- 10^5 -fach höhere Selektivität für Ca^{2+} gegenüber Mg^{2+}
- 1 : 1 Stöchiometrie

Im Gegensatz zum EGTA ist Quin-2 in bezug auf die Bindung von Ca^{2+} im physiologischen Bereich nicht pH-abhängig (TSIEN, 1983). Weiterhin findet Quin-2 auch sehr gute Verwendung als Ca^{2+} -Indikator, da sich bei der Bindung von Ca^{2+} an Quin-2 Absorption und Fluoreszenzverhalten des Moleküls verändern. Die Absorptionsänderung kommt durch eine Rotation der beiden Stickstoffatome um 90° bei der Komplexbildung mit Ca^{2+} zustande. Dabei geht die Konjugation der beiden freien Elektronenpaare des Stickstoffatoms mit den aromatischen Ringen verloren. Die Tetracarboxylatform des Quins ist hydrophil und



(a): $\text{X} = \text{O}^-$

(b): $\text{X} = \text{OCH}_2\text{OCOCH}_3$

Abb. 2.5 Die Struktur des Ca^{2+} -Chelators Quin-2 (a) und seines Acetoxymethyltetraesters (b)

Die Hydrolyse des Esters führt zu dem Chelatoranion, je vier Molekülen Acetat und Formaldehyd und acht Protonen.

kann daher die Zellmembran nicht passieren. Tsien gelang es jedoch, das Molekül in den hydrophoben Acetoxymethylester zu überführen (TSIEN, 1981). In dieser Form ist Quin-2 zwar membranpermeabel, kann jedoch kein Calcium binden. Im Cytoplasma wird der Ester dann durch die dort vorhandenen Acetylesterasen zur ursprünglichen, hydrophilen Ca^{2+} -Bindungsform (Tetracarboxylatchelator) hydrolysiert. Somit ist auch gewährleistet, daß Quin-2 die Zelle nicht wieder verlassen kann und auch nicht in Zellorganelle (wie z.B. Mitochondrien) abdiffundiert (siehe Abbildung 2.6).

Die Firma Amersham, Braunschweig, bei der Quin-2 als Tetraacetoxymethylester bezogen werden kann, hält Quin-2-Konzentrationen von 5 bis 50 μM und Inkubationszeiten von 20 bis 60 Minuten für ausreichend (Amersham, research news No. 28, 1983). Da jedoch vermutet wird, daß im Froschskelettmuskel nur eine geringe Esteraseaktivität vorhanden ist (TSIEN, 1983), wurde in den Experimenten mit 62 μM Quin-2 und 1- bis 2-stündiger Inkubationszeit gearbeitet. Der Quin-2-Ester wurde in DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöst und dann in Ca^{2+} -freien Ringer gegeben (nach TSIEN, 1983). Vor der Inkubation in der Quin-2-Lösung wurden die Präparate für 10 Minuten mit Ca^{2+} -freiem Ringer gespült. Damit ständig eine ausreichende Quin-2-Konzentration zur Diffusion in die Muskelfasern verfügbar war, wurde für jedes Experiment frische Quin-2-Lösung verwendet. Es ist nämlich nicht auszuschließen, daß Esterase aus bei der Präparation verletzten Fasern in die Badlösung diffundiert und dort die Konzentration an Quin-2-Ester durch Überführung in die nicht membranpermeable Quin-2-Säure vermindert. Bei der Hydrolyse des Quin-2-Esters zur Quin-2-Säure entsteht unter anderem auch Formaldehyd (s. Abb. 2.5). Mit großer Wahrscheinlichkeit kommt es jedoch wegen des niedrigen Cytokritwertes und der starken Permeabilität des Formaldehyds zu keinen hohen intrazellulären Formaldehydkonzentrationen (TSIEN, 1981). Dennoch wurde auch ein Experiment durchgeführt, in dem - bei ansonsten unveränderten Versuchsbedingungen - Quin-2 durch 1 mM Formaldehyd ersetzt war. Eine weitere Kontrolle wurde auch in 1 % DMSO-Lösung aufgenommen. In beiden Kontrollexperimenten waren jedoch keine signifikanten Veränderungen gegenüber den in Standard-

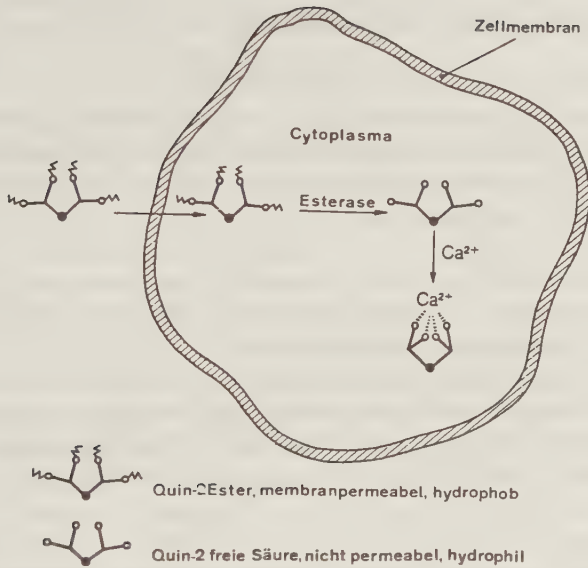


Abb. 2.6 Schematische Darstellung des Wirkungsmechanismus von Quin-2 (verändert nach Amersham, research news, No. 23, 1983)

Der hydrophobe Quin-2-Ester kann die Zellmembran passieren. In der Zelle wird er durch Esterasen zur hydrophilen Quin-2-Säure hydrolysiert. Die Quin-2-Säure kann als Ca^{2+} -Indikator fungieren.

lösung (Lsg. A oder Lsg. E) gemessenen Kontrakturen festzustellen.

2.3.5 Die Methode der Stoffwechselvergiftung

Durch den Einsatz von Stoffwechselgiften lassen sich die energieliefernden Reaktionen im Skelettmuskel spezifisch hemmen. Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Vergiftungsexperimente wurden Cyanid und Monojodacetat benutzt (s. Lsg. G).

Cyanid ist ein Hemmstoff des Elektronentransportes der Atmungskette. Es hemmt reversibel die Elektronenübertragung von Cytochrom a_3 auf Sauerstoff.

Monojodessigsäure ist ein Glykolysehemmstoff. Durch Blockade des Enzyms 3-Phosphoglycerinaldehyddehydrogenase wird irreversibel der Abbau von Glukose zu Milchsäure verhindert, so daß auch anaerob kein ATP hergestellt werden kann.

Zur Vergiftung wurden die Muskelpräparate 60 Minuten in Lösung G inkubiert. Nach 30 Minuten wurde die Lösung einmal erneuert.

3. ERGEBNISSE

3.1 Die Verschiebung der Inaktivierungskurve durch Verlängerung des konditionierenden Vorpulses oder Entzug des extrazellulären Calciums

Die Inaktivierungskurve wurde nach der Methode von FRANKENHAEUSER und LÄNNERGREN (1967) bestimmt. Dazu wurde die Muskelfaser für 1 Minute auf unterschiedliche Membranpotentiale depolarisiert. Direkt anschließend an diesen konditionierenden Vorpuls wurde die Restaktivität gemessen, die durch eine mehrere Sekunden dauernde Depolarisation auf 0 mV ausgelöst werden konnte. Diese Kraftentwicklung der Faser wurde auf eine Kontrolle normiert und ergab gegen das Membranpotential während des Vorpulses aufgetragen die Inaktivierungskurve (vgl. Abb. 2.2). FRANKENHAEUSER und LÄNNERGREN (1967) verwendeten zur Einstellung der gewünschten Potentiale Lösungen mit entsprechend erhöhten Kaliumionen (K^+)-Konzentrationen (HODGKIN & HOROWICZ, 1959). Dies ist möglich, da das Membranpotential einer Muskelzelle in erster Annäherung durch das Verhältnis der K^+ -Konzentration zu beiden Seiten der Membran bestimmt wird. Die K^+ -Kontraktur-Methode eignet sich jedoch nur für Experimente mit Einzelfasern, da bei einem mehrfaserigen Präparat nicht alle Fasern gleich schnell der veränderten K^+ -Konzentration ausgesetzt sind und daher ein Teil verzögert de- bzw. repolarisiert wird. Es läßt sich auch nicht ausschließen, daß die Verwendung erhöhter K^+ -Konzentrationen zu unerwünschten Nebenwirkungen auf das Präparat führt. Aus diesen und den in der Einleitung aufgeführten Gründen wurden die in dieser Arbeit dargestellten Inaktivierungsexperimente unter "voltage clamp"-Bedingungen gemessen.

Bislang wurde die Potentialabhängigkeit der Inaktivierung nur nach 1-minütiger Vorpulsdauer untersucht (FRANKENHAEUSER & LÄNNERGREN, 1967; LÜTTGAU & SPIECKER, 1979). Experimente von NAGAI et al. (1979) wiesen jedoch darauf hin, daß bei einer längeren konditionierenden Depolarisation der Inaktivierungsgrad bei einem vorgegebenen Potential weiter zunimmt. Der

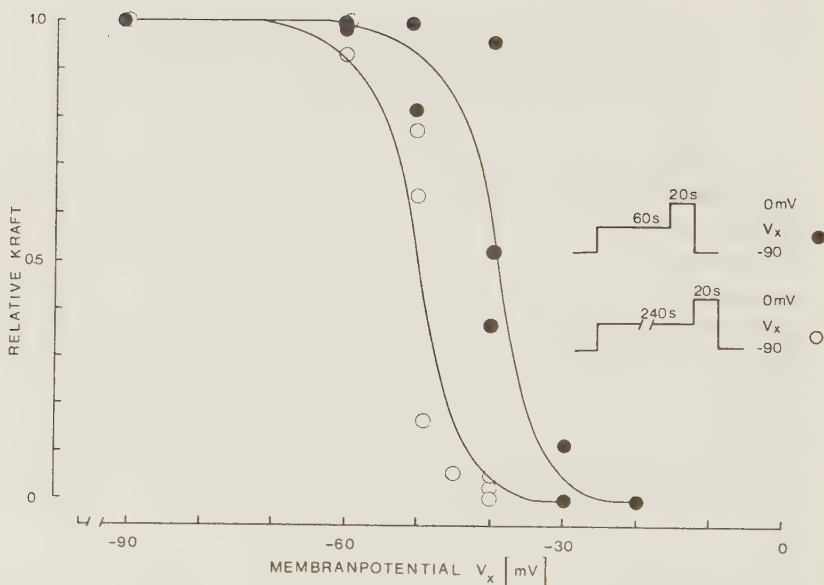


Abb. 3.1 Die Verschiebung der Inaktivierungskurve durch Verlängerung der konditionierenden Depolarisation

Diese beiden Inaktivierungskurven wurden nach 1- (●) und 4-minütiger (○) konditionierender Depolarisation an jeweils vier verschiedenen Muskelfasern aufgenommen (Lsg. E, $T = 6,5$ bis 7°C). Alle in dieser Arbeit dargestellten Inaktivierungskurven wurden nach der in 2.2.2 beschriebenen Methode von FRANKENHAEUSER und LÄNNERGREN (1967) gemessen. Eine schematische Darstellung des Pulsprogramms ist jeweils in die Abbildungen eingefügt. Auf der Abszisse der Diagramme ist stets das Potential des konditionierenden Vorpulses V_x aufgetragen und auf der Ordinate die nach der Inaktivierung bei Depolarisation auf 0 mV noch meßbare Kontrakturamplitude (als relative Kraft auf eine jeweils vorher ausgelöste Kontrolle normiert). Alle Inaktivierungskurven wurden nach Augenmaß gezeichnet.

Effekt ließ sich in Lösungen mit niedriger Calciumkonzentration noch verstärken. Diese Befunde bedeuten für die Fragestellung der vorliegenden Arbeit, daß die Potentialabhängigkeit der Inaktivierung durch eine Verlängerung der Vorpulsdauer oder auch durch Entzug des extrazellulären Calciums in den negativen Potentialbereich verschoben werden sollte. Es war jedoch experimentell nicht möglich, die konditionierende Membrandepolarisation über 4 Minuten hinaus zu verlängern, da die Lebensdauer der Muskelpreparate durch längere Vordepolarisationen stark verkürzt wurde.

Alle Inaktivierungskurven wurden bei 6 bis 7 °C aufgenommen. Die Kurven mit 1 Minute Vorpulsdauer entsprechen bezüglich Lage und Verlauf in etwa den Inaktivierungskurven, die von SPIECKER (1980) bei Zimmertemperatur (20 bis 24 °C) gemessen wurden. Dies zeigt, daß die Potentialabhängigkeit der Inaktivierung unter diesen Versuchsbedingungen nicht wesentlich durch die Temperatur beeinflusst wird.

Wie in Abbildung 3.1 dargestellt ist, ergab eine Verlängerung des konditionierenden Vorpulses von 1 Minute auf 4 Minuten eine Verschiebung der Inaktivierungskurve um etwa 10 mV in Richtung negativerer Potentiale. Bei der graphischen Darstellung dieser und aller weiteren Inaktivierungskurven der vorliegenden Arbeit wurde aufgrund der wenigen Meßwerte jeweils eine Parallelverschiebung der Kontrollkurve (1-minütiger Vorpuls, Lsg. E, T = 6,5 bis 7 °C) durch den experimentellen Eingriff angenommen. Eine Parallelverschiebung würde auch nach den in der Diskussion besprochenen Modellen zu erwarten sein.

In weiteren Experimenten wurde der Einfluß Ca^{2+} -freier Versuchslösung (Lsg. F) auf die Potentialabhängigkeit der Inaktivierung untersucht (Abb. 3.2). Diese Versuchsbedingung veränderte die Lage der Inaktivierungskurve ähnlich wie die Verlängerung der Vorpulsdauer. So wurde durch den Entzug des extrazellulären Calciums die nach 1-minütiger Vorpulsdauer gemessene Inaktivierungskurve um mehr als 20 mV in Richtung negativerer Membranpotentiale verlagert. Bei einem 4-minü-

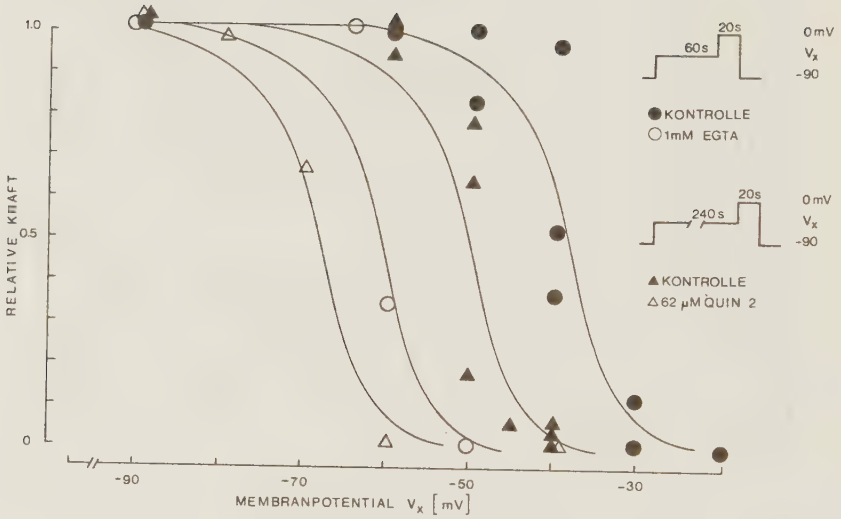


Abb. 3.2 Die Verschiebung der Inaktivierungskurve durch Entzug des extrazellulären Calciums

Die Kontrollkurven wurden in TEA-Sulfat-Lösung (Lsg. E) an jeweils vier Muskelfasern nach 1- (●) und 4-minütigem Vorpuls (▲) aufgenommen. Die Experimente zu den beiden übrigen Kurven wurden in Ca^{2+} -freier TEA-Sulfat-Lösung (Lsg. F) nach 1-minütigem Vorpuls an zwei Muskelfasern (○) sowie nach 4-minütigem Vorpuls an einer Muskelfaser (△) durchgeführt. Die in der Abbildung mit Quin-2 gekennzeichnete Kurve wurde an einem Präparat gemessen, das vor Beginn des Experimentes für eine Stunde in Quin-2-Lösung inkubierte (intrazellulär wirksamer Ca^{2+} -Chelator, s. 2.3.4 u. 3.4). Die Versuchstemperatur betrug 6,5 bis 7°C. Weitere Angaben zum Versuchsablauf und zur graphischen Darstellung sind dem Text und der Abbildung 3.1 zu entnehmen.

tigen Vorpuls in Ca^{2+} -freier Lösung verschob sich die Inaktivierungskurve sogar um etwa -30 mV.

3.2 Der Einfluß von Na-Dantrolen auf die mechanische Inaktivierung

Na-Dantrolen ist ein synthetisches Hydantoinderivat, das von SNYDER und Mitarbeitern (1967) hergestellt wurde. Es hemmt die elektromechanische Kopplung, beeinflusst dabei aber nicht die elektrischen Eigenschaften der Skelettmuskelfaser (ELLIS & BRYANT, 1972; ELLIS & CARPENTER, 1972; HAINAUT & DESMEDT, 1974; PUTNEY & BIANCHI, 1974).

DESMEDT und HAINAUT (1977) zeigten in Experimenten mit dem Ca^{2+} -sensitiven Photoprotein Aequorin, daß die Anwendung von Na-Dantrolen zu einer drastischen Reduzierung der freien intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt, wahrscheinlich verursacht durch eine Hemmung der Ca^{2+} -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum, sowohl im Ruhezustand als auch bei Aktivierung der Faser. Daher lag es nahe, durch die Verwendung von Na-Dantrolen den Einfluß einer erniedrigten intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration auf die Inaktivierung der mechanischen Kraft zu untersuchen.

Die im folgenden beschriebenen Experimente begannen frühestens 10 Minuten nach Beginn der Einwirkung von 25 μM Dantrolen (Lösung für die Messung der Tetani: Lsg. A + Dantrolen; Lösung für die "voltage clamp"-Messungen: Lsg. E + Dantrolen; siehe auch 2.3.2). Die Inkubationsdauer war in jedem Fall ausreichend, um die Ca^{2+} -Ausschüttung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum genügend zu blockieren und die freie intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration zu reduzieren, da Messungen an Einzelfasern zeigten, daß die Dantrolenwirkung schon nach 30 Sekunden eintritt (HAINAUT & DESMEDT, 1974). Die Kontrollen zu den Experimenten wurden in Ringer-Lösung (Lsg. A) oder in TEA-Sulfat-Lösung (Lsg. E) aufgenommen. In Abbildung 3.3 und 3.4 ist der Einfluß von Dantrolen auf Kontraktion, Tetanus und Kontraktur dargestellt. Dantrolen verkleinerte in erster Linie die Zuckungsamplitude der

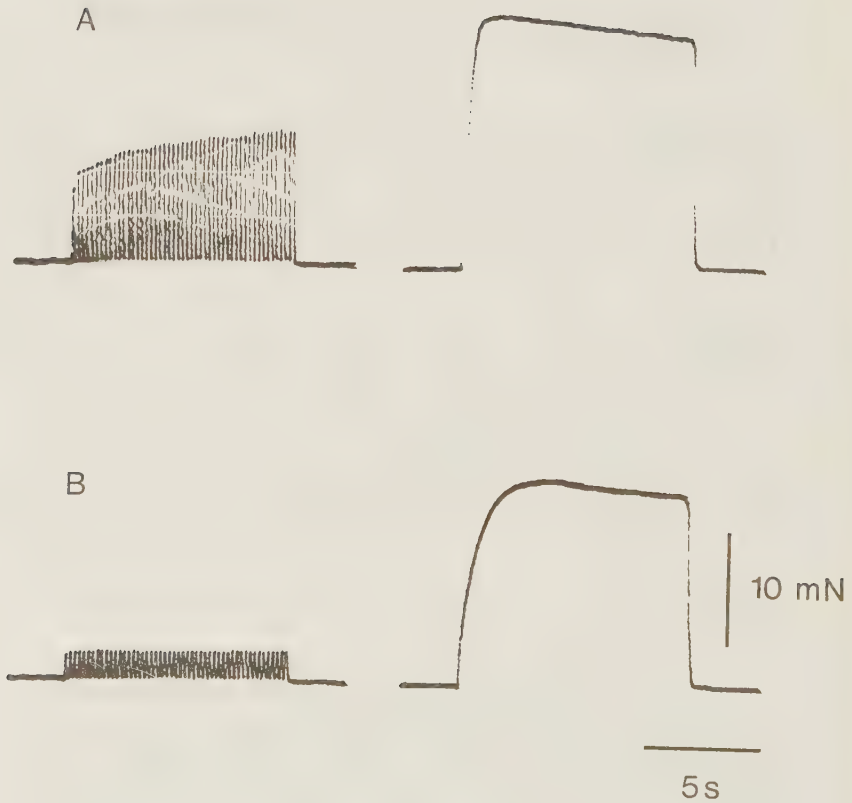


Abb. 3.3 Der Einfluß von Dantrolen auf Zuckungen und Tetani

Ein Zehenmuskelpreparat, bestehend aus 30 bis 40 Fasern wurde in Dantrolen-Lösung (Lsg. A + 25 μM Dantrolen) extrazellulär gereizt (B). Die Kontrollen (A) wurden zuvor in Ringer-Lösung aufgenommen.

Reizfrequenz für die Zuckungen/Tetani: 5 Hz/20 Hz

Dauer der Einzelreize: 1 ms

Reizstärke: Übermaximal

Temperatur: 7°C

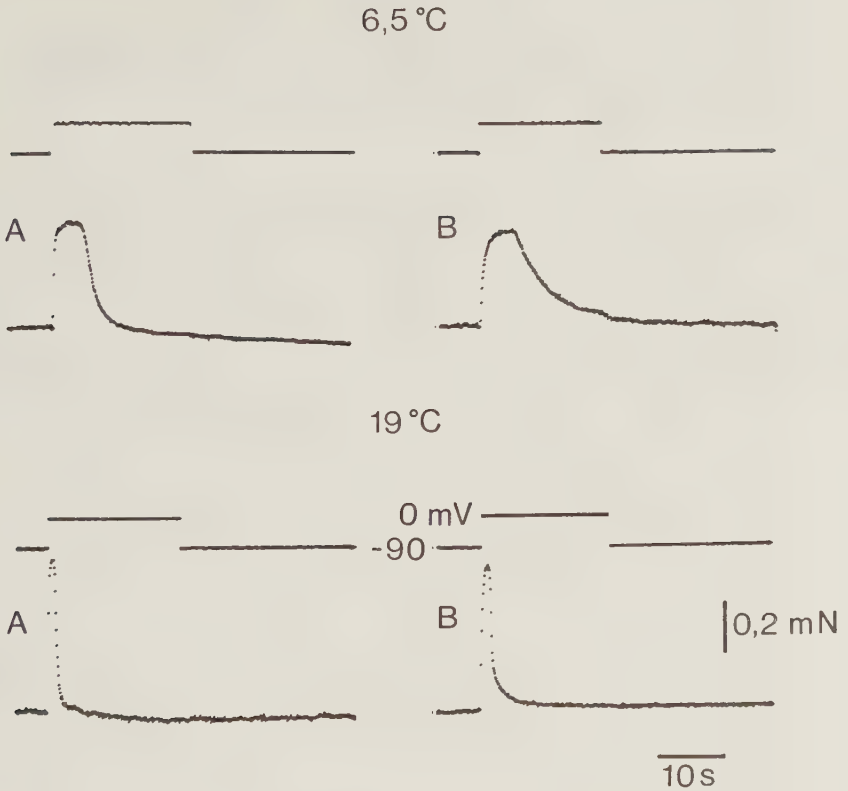


Abb. 3.4 Der Einfluß von Dantrolen auf die Kontraktur

Die Kontrakturen wurden durch eine 20 Sekunden dauernde Depolarisation zweier Muskelfasern (unterschiedliche Fasern bei 6,5 und 19 °C) von -90 auf 0 mV ausgelöst. Die Kontrollen (A) wurden in TEA-Sulfat-Lösung (Lsg. E) aufgenommen, die Dantrolen-Kontrakturen (B) in TEA-Sulfat-Lösung + 25 μ M Dantrolen.

Muskelfaser; die Amplituden von Tetanus und maximaler Kontraktur wurden nur wenig beeinflusst. Andere Autoren kamen zu ähnlichen Ergebnissen. So wurde an Einzelfasern durch Dantrolen die Kontraktionshöhe um bis zu 75 % verringert, Tetanus und maximale Kaliumkontraktur waren kaum verändert (HAINAUT & DESMEDT, 1974; TAKAUJI & NAGAI, 1977).

Die Zugabe von Dantrolen führte zu einer starken Abnahme der Anstiegssteilheit von Tetanus und Kontraktur (vgl. Abb. 3.3 u. 3.4). Dieser Befund spricht dafür, daß die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration, die eine Faser zur maximalen Kraftentwicklung benötigt, in Dantrolen-Lösung erst nach einem längeren Zeitraum als in Kontrolllösung erreicht wird. Entgegen den Erwartungen dauerten die Kontrakturen in Dantrolen-Lösung länger, sichtbar in einer langsameren Relaxation der Kontrakturen. Dieser Effekt steht im Widerspruch zu der anfangs aufgestellten Hypothese, daß die Verringerung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration durch Dantrolen den Inaktivierungsprozeß beschleunigt. Die Verlängerung der Kontraktdauer durch Dantrolen war bei niedriger Versuchstemperatur stärker ausgeprägt als bei höherer Temperatur. Da dies auf eine Temperaturabhängigkeit des Dantroleneffektes hinwies, wurden alle weiteren Experimente mit Dantrolen bei etwa 7 und 19 °C durchgeführt. Die Kontrollkurven wurden bei 6,5 °C aufgenommen und in einigen Punkten bei 19 °C überprüft (vgl. auch 3.1).

In Abbildung 3.5 sind Inaktivierungskurven dargestellt, die in Dantrolen-Lösung nach der Methode von FRANKENHAEUSER und LÄNNERGREN (1967) gemessen wurden (Methode vgl. 2.2.2). Bei einer Versuchstemperatur von 18,5 °C wurde die Inaktivierungskurve durch Dantrolen in die Richtung negativerer Potentiale verschoben. Bei 6,5 °C trat eine Verlagerung in die entgegengesetzte Richtung auf. Auch TAKAUJI und NAGAI (1977), die den Inaktivierungsprozeß mit Hilfe von Kaliumkontrakturen untersuchten, fanden bei höherer Temperatur eine Verschiebung der Inaktivierungskurve durch Dantrolen zu negativeren Membranpotentialen. Unter diesen Versuchsbedingungen konnten die Autoren auch eine deutliche Verkürzung des Kontrakturenplateaus und eine beschleunigte Relaxationsphase der Kon-

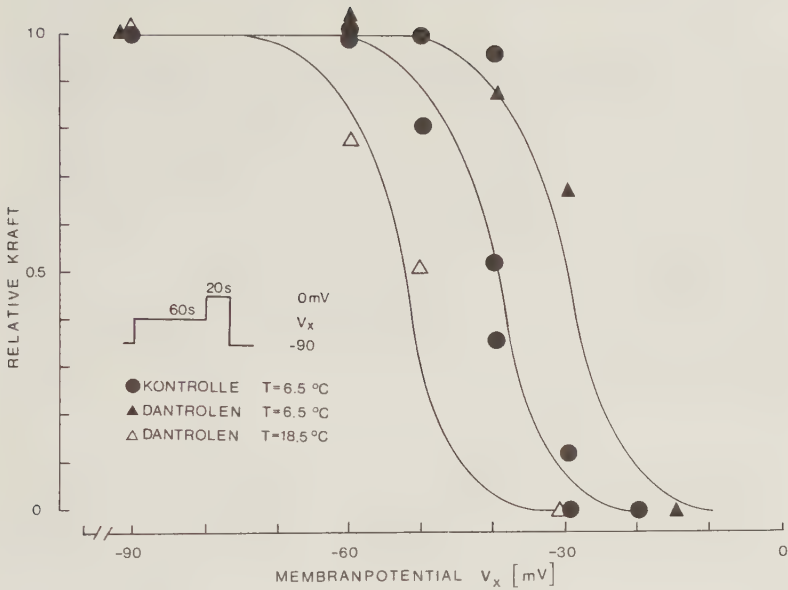


Abb. 3.5 Der Einfluß von Dantrolen auf die Inaktivierungskurve

Die beiden Dantrolen-Inaktivierungskurven enthalten Meßwerte von jeweils zwei verschiedenen Muskelfasern. Sie wurden in Lösung E + 25 μM Dantrolen bei $6,5^\circ\text{C}$ (▲) und bei $18,5^\circ\text{C}$ (△) gemessen. Die Kontrollkurve (●) wurde bei $6,5$ bis 7°C an vier Fasern in Lösung E aufgenommen. Alle weiteren Angaben zur Methode und zur graphischen Darstellung sind der Abbildung 3.1 und dem Text 3.1 zu entnehmen.

traktur feststellen. Beide Effekte waren potentialabhängig und bei maximaler Aktivierung am schwächsten ausgeprägt.

Da Dantrolen in Abhängigkeit von der Temperatur entgegengesetzte Wirkungen auf die Potentialabhängigkeit der Inaktivierung zeigte, wurde ebenfalls der Temperatureffekt auf die Zeitabhängigkeit der Inaktivierung untersucht. Bei diesen Messungen wurden die Fasern zur Inaktivierung für eine variable Zeit stets auf das gleiche Membranpotential depolarisiert und anschließend durch Depolarisation auf 0 mV maximal aktiviert. Für den konditionierenden Vorpuls wurde ein Membranpotential von -60 mV gewählt, da eine mehrere Minuten dauernde Depolarisation auf weniger negative Membranpotentiale als etwa -60 mV erfahrungsgemäß die Lebensdauer der Muskelfaser stark verkürzte.

In Abb. 3.6 sind die aus diesen Experimenten resultierenden Kurven dargestellt. Die Kontrollkurve wurde bei 7 °C in Lösung E an einer Faser aufgenommen. Eine bis zu 2-minütige Inaktivierung bei -60 mV hatte keinen Effekt auf die Kontrakturspannung. Erst nach einer Inaktivierungsdauer von 4 Minuten wurde die Kontraktur auf ungefähr 70 % ihrer anfänglichen Höhe reduziert. Diese Amplitude wurde durch Verlängerung des konditionierenden Vorpulses bis auf 10 Minuten im weiteren Verlauf des Experimentes nicht unterschritten. Die Messung in Dantrolen-Lösung (Lsg. E + 25 µM Dantrolen) wurden bei 6,5 °C an jeweils drei verschiedenen Fasern durchgeführt. Wie aus der Abbildung ersichtlich ist, trat bei 6,5 °C keine deutliche Verminderung der Kontrakturamplitude auf, selbst nicht nach einer 16 Minuten dauernden Inaktivierung bei -60 mV. Dagegen wurde in Dantrolen-Lösung bei einer Versuchstemperatur von 19,5 °C schon nach - im Vergleich zur Kontrollkurve - kleineren Inaktivierungsintervallen eine sichtbare Reduktion der Kontrakturamplitude verursacht. Nach einer Vorpulsdauer von 2 Minuten wurden nur noch 80 % der anfänglichen Kontrakturspannung erreicht und nach 12-minütiger Inaktivierung sogar nur noch 20 %. Auf eine Wiederholung der Kontrollmessungen bei 19 °C wurde verzichtet, da ein Vergleich mit ähnlichen Messungen anderer Autoren zeigte, daß die Zeitabhängigkeit der Inaktivierung in Kontrolllösung durch

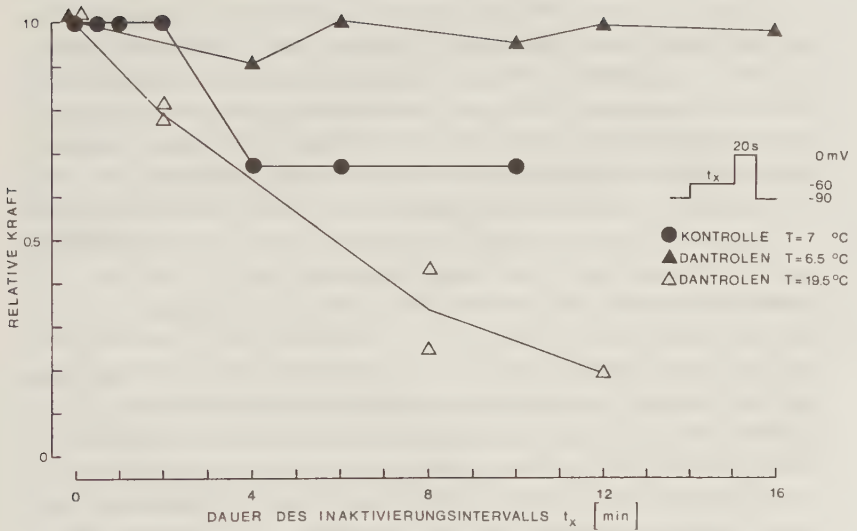


Abb. 3.6 Der Einfluß von Dantrolen auf die Zeitabhängigkeit der mechanischen Inaktivierung

Die Muskelfasern wurden für unterschiedliche Zeiten von -90 mV auf ein Membranpotential von -60 mV depolarisiert. Sofort anschließend wurde die noch verbliebene Restkontraktilität durch Depolarisation auf 0 mV bestimmt. Die Amplitude dieser Kontraktur wurde auf eine vorher ausgelöste Kontrolle normiert. Auf der Abszisse des Diagramms ist die Dauer des konditionierenden Vorpulses dargestellt, auf der Ordinate die relative Kraftentwicklung. Die Kontrollen (●) wurden an einer Faser bei 7°C in Lösung E aufgenommen, die Dantrolen-Kurven an jeweils drei Fasern in Lösung E + 25 µM Dantrolen bei 6,5°C (▲) und bei 19,5°C (△).

die Versuchstemperatur nicht wesentlich beeinflußt wird (NAGAI, TAKAUJI, KOSAKA & TSUTSU-URA, 1979).

Alle mit Dantrolen durchgeführten Inaktivierungsexperimente deuten darauf hin, daß die Wirkung von Dantrolen auf den Inaktivierungsprozeß temperaturabhängig ist. Bei einer hohen Versuchstemperatur wird der Inaktivierungsprozeß durch Dantrolen beschleunigt, bei niedriger Temperatur eher gehemmt. Diese Temperaturabhängigkeit des Dantroleneffektes, die in der Literatur noch nicht beschrieben wurde, ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß die Dantrolenwirkung bislang nur am Säugermuskel (Versuchstemperatur: 38 °C) und am Froschmuskel bei Zimmertemperatur untersucht wurde.

Die Reversibilität des Dantroleneffektes wurde nicht geprüft, da die für die meisten Experimente verwendete "voltage clamp"-Methode einen Lösungswechsel stark erschwerte und außerdem bei dem mehrfaserigen Präparat zusätzlich mit sehr langen Auswaschzeiten zu rechnen war. Aus der Literatur läßt sich jedoch entnehmen, daß die normalen Kontraktionen von Einzelfasern in Ringer-Lösung innerhalb von 30 bis 60 Minuten wiederhergestellt werden (HAINAUT & DESMEDT, 1974). Diese lange Zeit zum Auswaschen des Effektes im Zusammenhang mit der ausgezeichneten Lipidlöslichkeit des Moleküls ist ein Anzeichen für einen intrazellulären Wirkort. Dabei könnte es sich nach DESMEDT und HAINAUT (1977) um das sarkoplasmatische Retikulum handeln. Es kann jedoch auch nicht ausgeschlossen werden, daß Dantrolen zusätzlich andere Ca^{2+} -Bindungsstellen und Ca^{2+} -Speicher der Zelle beeinflußt.

3.3 Die Zeitabhängigkeit der Inaktivierung in Ca^{2+} -freier Versuchslösung

Die in 3.1 dargestellten Experimente zeigen, daß der Grad der Inaktivierung bei einem bestimmten Membranpotential durch eine Verlängerung der konditionierenden Depolarisation oder durch den Entzug des extrazellulären Calciums erhöht werden kann. Wie die Abbildung 3.2 zeigt, konnte in Ca^{2+} -freier Versuchslösung schon durch eine 1-minütige Vordepolarisation

auf -50 mV eine vollständige Inaktivierung der mechanischen Kraft erzielt werden. In Ca^{2+} -haltiger Versuchslösung wurden dagegen nach 1-minütigem Vorpuls auf -50 mV noch maximale Kontrakturen gemessen. Allein auf Grund der in 3.1 dargestellten Experimente konnten keine Aussagen darüber gemacht werden, ob in Ca^{2+} -freier Versuchslösung nicht auch noch kürzere Vordepolarisationen auf -50 mV zu einer vollständigen Inaktivierung der mechanischen Kraft führen. Diese Möglichkeit sollte mit den im folgenden beschriebenen Untersuchungen zur Zeitabhängigkeit der Inaktivierung genau untersucht werden.

In den Experimenten wurden die Fasern für unterschiedliche Zeiten von -90 mV ausgehend zuerst auf -50 mV (kond. Vorpuls) und anschließend zur maximalen Aktivierung auf 0 mV depolarisiert. Zwischen zwei Inaktivierungsexperimenten wurde stets eine Kontrollkontraktur aufgenommen, so daß die nach einem konditionierenden Vorpuls ausgelöste Kontraktur immer mit der vorangegangenen und folgenden Kontrollkontraktur verglichen werden konnte. Bei vielen Muskelfasern führten die Depolarisationen auf -50 mV zu sekundären Effekten wie spontanen, anhaltenden Kraftentwicklungen, ohne Rückkehr auf die Ruhespannung. Dies veränderte die Ausgangsbedingungen vor der maximalen Aktivierung auf 0 mV derart, daß in diesen Fällen eine Berücksichtigung bei der Auswertung nicht sinnvoll erschien.

In Abbildung 3.7 sind die Meßwerte eines Experimentes dargestellt, das an einer einzigen Muskelfaser durchgeführt wurde. Dieses Experiment konnte an weiteren Muskelfasern nicht vollständig reproduziert werden. Nach vier bis fünf Aktivierungen gingen die Muskelfasern in den Rigorzustand oder entwickelten keine maximale Kraft mehr, so daß durch weitere Experimente nur die ersten fünf Punkte von Abbildung 3.7 abgesichert wurden. Die dreidimensionale Darstellungsform in Abbildung 3.7 war erforderlich, da sich die Abhängigkeit zwischen relativer Kraft und Dauer des Inaktivierungsintervalls im Laufe des Experimentes veränderte. So wurde zu Beginn des Experimentes nach einem 1-minütigen Inaktivierungsintervall noch die maximale Kraft gemessen, während zum Schluß der

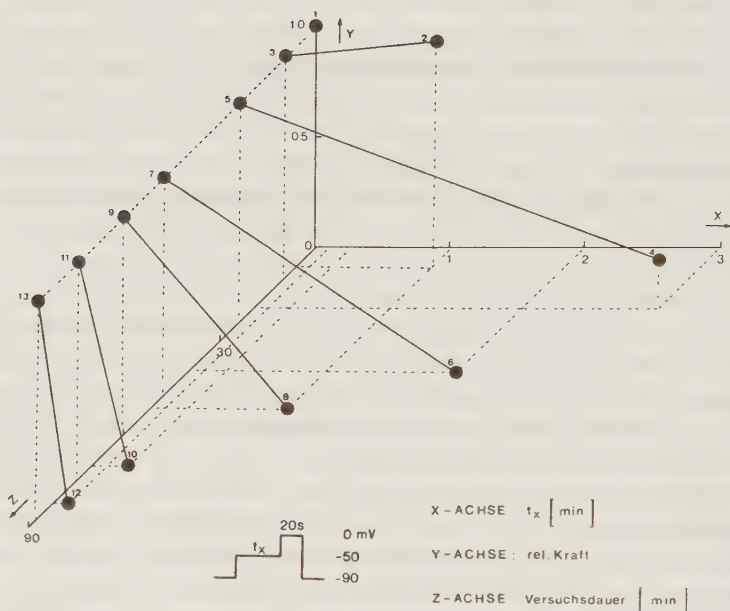


Abb. 3.7 Die Abhängigkeit der Inaktivierung von der Dauer des Inaktivierungsintervalls und der Versuchsdauer in Ca^{2+} -freier Lösung

Die einzelnen Punkte des Diagramms wurden in der Reihenfolge der Numerierung an einer Faser aufgenommen. Jeweils zwischen den einzelnen Inaktivierungsexperimenten wurden Kontrollmessungen durchgeführt. Alle Meßpunkte dieser Kontrollen liegen auf einer Geraden, die parallel zur Z-Achse verläuft. Die Kontrollpunkte sind durch Geraden mit den Meßpunkten der jeweils vorhergegangenen Aktivierungen verbunden. Die zunehmende Steigung dieser Verbindungsgeraden verdeutlicht die mit fortschreitender Versuchsdauer erfolgende Änderung in der Beziehung zwischen relativer Kraft und Dauer des Inaktivierungsintervalls.

Das Experiment wurde in Lösung F bei 19°C nach der im Text (s.o.) beschriebenen Methode durchgeführt. Auf der Y-Achse des Diagramms ist die relative Kraft angegeben und auf der X-Achse die Dauer des Inaktivierungsintervalls. Die Z-Achse verdeutlicht die Versuchsdauer.

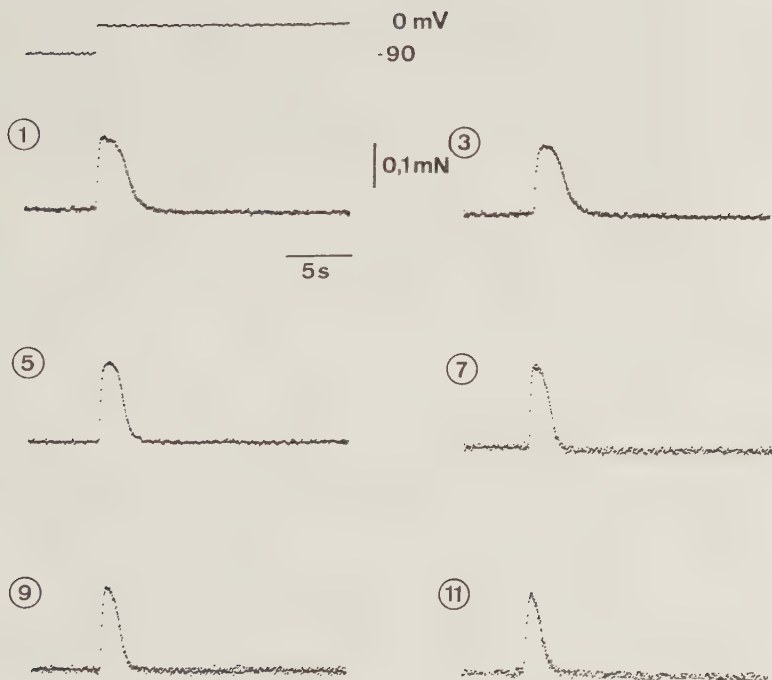


Abb. 3.8 Die Verkürzung des Kontrakturplateaus während des in 3.3 beschriebenen Experimentes

Dargestellt sind die der Abbildung 3.7 zugrunde liegenden Kontrollkontraktionen, welche in der Reihenfolge ihrer Nummerierung an einer Faser aufgenommen wurden (Kennzeichnung der Kontraktionen entsprechend Abb. 3.7). Das Pulsprogramm und die Versuchsbedingungen des Experimentes sind der Abbildung 3.7 zu entnehmen.

Untersuchungen schon eine Vorpulsdauer von 5 Sekunden zur vollständigen Inaktivierung der mechanischen Kraft führte. Die Indices der in Abbildung 3.7 eingezeichneten Punkte geben die zeitliche Reihenfolge der Aktivierungen an. Alle Kontrollkontraktionen liegen auf einer Geraden, die parallel zur z-Achse (Versuchsdauer) des Koordinatensystems verläuft. Die einzelnen Kontrollpunkte sind jeweils durch eine Gerade mit dem Meßpunkt der vorangegangenen Aktivierung verbunden. Die Steigung dieser Geraden nimmt mit fortlaufender Versuchsdauer zu. Dadurch kommt zum Ausdruck, daß die Abhängigkeit der relativen Kraft von der Dauer des Inaktivierungsintervalls durch die Versuchsdauer bestimmt wurde.

Auch die Form der Kontraktionen änderte sich im Verlauf des Experimentes. Wie Abbildung 3.8 zeigt, setzte zwischen der dritten und vierten Aktivierung eine Verkürzung des Kontrakturplateaus ein. Kurze Kontraktionen sind jedoch typisch für Versuchslösungen mit extrem niedrigem Ca^{2+} -Gehalt. Dies könnte bedeuten, daß die Ca^{2+} -Konzentration im T-Tubulus oder an einer anderen für die elektromechanische Kopplung entscheidenden Stelle erst im Verlauf des Experimentes herabgesetzt wurde. Dabei handelt es sich jedoch vermutlich nicht um ein einfaches Diffusionsproblem, da auch durch längere Wartezeiten vor Beginn der Messungen keine Verbesserung erzielt werden konnte. Es muß daher angenommen werden, daß die Muskelfasern erst durch mehrere Aktivierungen in einen Zustand gebracht werden, der zu schnellen Inaktivierungen der mechanischen Kraft führt.

3.4 Die Wirkung von Quin-2 auf die mechanische Inaktivierung

Die in Ca^{2+} -freien Versuchslösungen durchgeführten Experimente (vgl. 3.1 u. 3.3) deuteten darauf hin, daß der Inaktivierungsprozeß durch eine Verringerung der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration beschleunigt wird. Möglicherweise ist jedoch der Entzug des extrazellulären Calciums nicht direkt für die gezeigten Effekte verantwortlich. Neuere Untersuchun-

gen von LÓPEZ und Mitarbeitern (1983) zeigen, daß der Entzug des extrazellulären Calciums zu einer Erniedrigung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt (von $1,2 \times 10^{-7}$ M auf 4×10^{-8} M). Damit kommt als unmittelbare Ursache für die beschleunigte Inaktivierung in Ca^{2+} -freier Lösung auch eine verringerte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration in Frage. Für eine Schlüsselfunktion des freien intrazellulären Calciums im Inaktivierungsprozeß sprechen auch die Inaktivierungsexperimente mit Na-Dantrolen (vgl. 3.2), einem Pharmakon, das nachweislich die cytoplasmatische Ca^{2+} -Konzentration herabsetzt (DESMEDT & HAINAUT, 1977). Um diese Abhängigkeit des Inaktivierungsprozesses von der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration weiter charakterisieren zu können, wurden die im folgenden beschriebenen Untersuchungen mit dem intrazellulär wirksamen Ca^{2+} -Chelator Quin-2 durchgeführt.

Der Quin-2-Ester wurde in Ca^{2+} -freier Ringer-Lösung (Lsg. B) zu einer Endkonzentration von $62 \mu\text{M}$ gelöst. In dieser Lösung inkubierten die Zehenmuskelpräparate bei Zimmertemperatur für 1 bis 2 Stunden. Dies ist notwendig, da der Quin-2-Ester inaktiv ist, also kein Calcium binden kann. Er muß erst die Zellmembran der Muskelfaser permeieren und wird dann in der Zelle durch die dort vorhandenen Esterasen zum aktiven Ca^{2+} -Chelator, der Quin-Säure, hydrolysiert (ausführlich beschrieben in 2.3.4). Die "voltage clamp"-Experimente wurden nach Beendigung der Inkubation in Ca^{2+} -freier TEA-Lösung (Lsg. F) bei 6 bis 7°C durchgeführt.

Die intrazelluläre Quin-2-Konzentration zum Zeitpunkt des Experimentes kann nicht genau angegeben werden. Es sollte zwar nach genügend langer Inkubationszeit im Innern der Zelle die gleiche Konzentration an Quin-2-Ester wie in der Inkubationslösung vorliegen. Da jedoch im Intrazellulärraum der Quin-2-Ester durch Überführung in die Quin-2-Säure ständig aus dem Diffusionsgleichgewicht entfernt wird, besteht die Möglichkeit, daß sich in der Zelle Quin-2-Säure in höherer Konzentration anreichert.

Die Quin-2-Lösung wurde für jede Inkubation frisch angesetzt, da nicht auszuschließen war, daß Esterase aus den verletzten

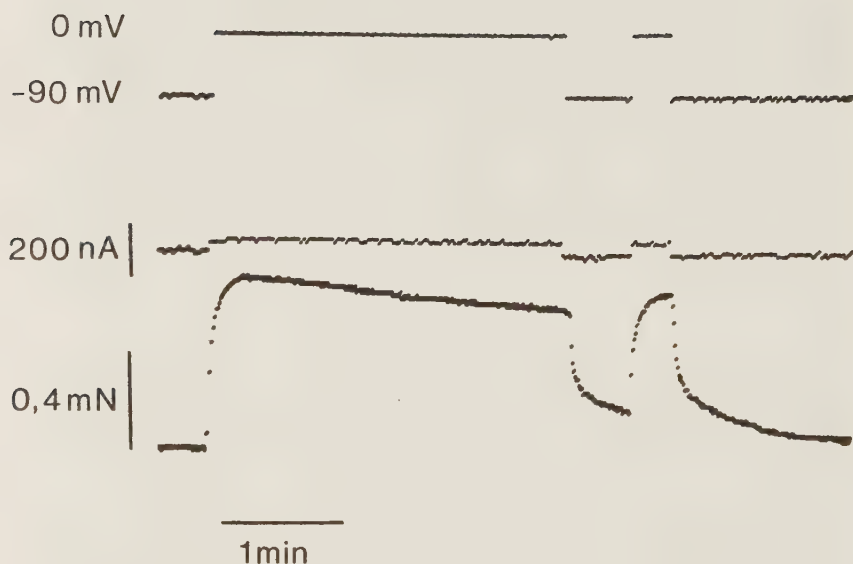


Abb. 3.9 Der Einfluß von Quin-2 auf die Inaktivierung der mechanischen Kraft

Bei langandauernder Depolarisation einer Muskelfasermembran setzt normalerweise nach etwa 5 Sekunden eine spontane Relaxation der mechanischen Kraft ein (vgl. Abb. 2.1). Dies war nach Inkubation in Quin-2-Lösung nicht mehr festzustellen. Eine Reduktion der Kraftentwicklung erfolgte erst bei einer Repolarisation der Muskelfaser auf -90 mV. Das abgebildete Experiment wurde 135 Minuten nach Beginn der Inkubation in Quin-2-Lösung (Dauer 60 min) bei 6,5°C in Lösung F durchgeführt.

Fasern des Präparates in die Lösung diffundiert und den Quin-2-Ester schon dort in die nicht membranpermeable Quin-2-Säure überführt.

Es wurde erwartet, daß Quin-2 eine beschleunigte Inaktivierung der mechanischen Kraft verursacht und damit die Inaktivierungskurve in den negativen Potentialbereich verlagert. Wie Abbildung 3.9 zeigt, trat jedoch ein eher entgegengesetzter Effekt ein. So fand nach Inkubation in Quin-2-Lösung keine spontane Relaxation der mechanischen Kraft mehr statt. Während der gesamten Depolarisationsdauer von 3 Minuten entwickelten die Muskelfasern fast unverändert maximale Spannung. Erst bei Repolarisation auf -90 mV erschlafften sie in 2 bis 3 Sekunden auf ungefähr 50 % des maximalen Wertes und erreichten dann wieder innerhalb von mehreren Minuten ihren Ruhespannungswert. Nach einer Repolarisationszeit von 35 Sekunden auf einem Membranpotential von -90 mV ließ sich erneut eine maximale Kraft durch Depolarisation auf 0 mV auslösen. Die Spannung, die während der zweiten Kontraktur erreicht wurde, verminderte sich bei Beendigung des Pulses mit etwa der gleichen Kinetik wie bei der ersten Kontraktur. Ähnliche Experimente konnten an mehreren Fasern wiederholt werden. Auffallend war, daß die Verlängerung der Kontrakturdauer durch Quin-2 in allen Experimenten erst etwa 60 Minuten nach Beendigung der Inkubation in Quin-2-Ester auftrat. Dieses verzögerte Einsetzen des Quin-2-Effektes läßt sich durch eine geringe Esteraseaktivität im Froschskelettmuskel erklären (TSIEN, 1983). Es besteht aber auch die Möglichkeit, daß der Quin-2-Effekt erst in Folge einiger maximaler Aktivierungen im Verlauf des Experimentes eintrat, da die jeweils mit den Aktivierungen einhergehende Ca^{2+} -Freisetzung zu einer vermehrten Bindung von Ca^{2+} an Quin-2 führen könnte.

Die zu Beginn eines Experimentes gemessenen Kontrakturen waren durch eine zweiphasige Inaktivierung gekennzeichnet. Die erste Phase bestand in einer spontanen Reduktion der Kraft nach ungefähr 5 Sekunden auf 50 bis 70 % der maximalen Spannung. Danach verringerte sich die noch verbliebene Kraft langsamer in Richtung auf den Ruhespannungswert. Die zweite Phase der Inaktivierung ließ sich durch vorzeitige Beendigung

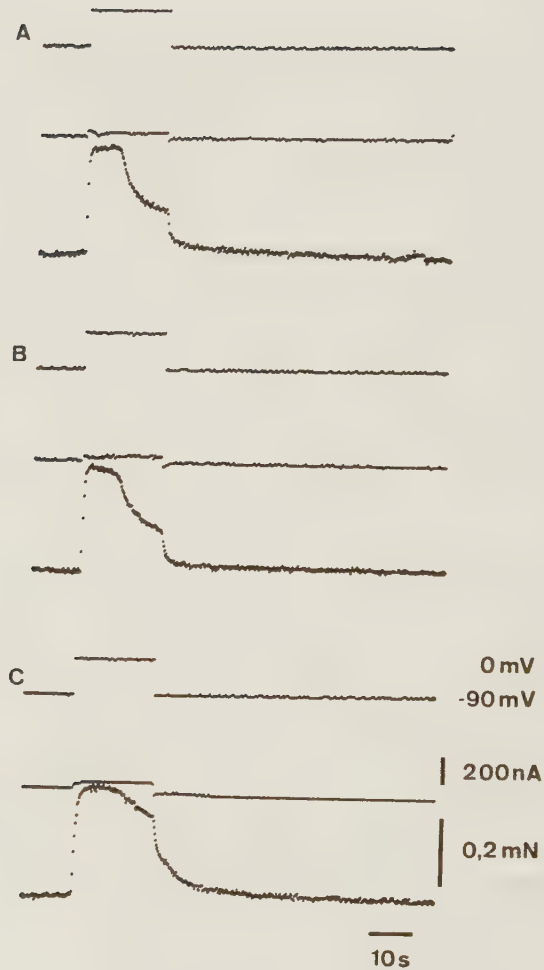


Abb. 3.10 Die Zeitabhängigkeit des Quin-2-Effektes

Die Kontrakturen wurden bei 6,5°C in Lösung F 120 Minuten (A), 135 Minuten (B) und 150 Minuten (C) nach Beginn der Inkubation in Quin-2-Lösung (Dauer 60 Minuten) aufgenommen.

der Depolarisation abkürzen. Mit zunehmender Versuchsdauer verschwand die erste schnelle Phase der Inaktivierung. Gleichzeitig erfolgte in der zweiten Phase die Erschlaffung immer langsamer. Schließlich nach etwa 60 Minuten war während der gesamten Depolarisationsdauer nur noch eine einzige fast maximale Spannungsentwicklung festzustellen. In Abb. 3.10 ist ein Experiment dargestellt, das diese Zeitabhängigkeit der durch Quin-2 verursachten Kontrakturverlängerung zeigt.

In allen Experimenten mit Quin-2 verursachte die Repolarisation auf -90 mV eine Relaxation der zu diesem Zeitpunkt noch andauernden Kraftentwicklung in Richtung des Ruhespannungswertes. An einer Muskelfaser wurde untersucht, ob auch schon Repolarisationen auf weniger negative Potentiale als -90 mV zu einer Beendigung der langen Quin-2-Kontrakturen führen. Das betreffende Experiment ist in Abbildung 3.11 dargestellt. Nach der Depolarisation von -90 mV auf 0 mV wurde die Muskelfaser zuerst für 20 Sekunden auf ein Zwischenpotential und dann wieder auf -90 mV repolarisiert. Dabei zeigte sich, daß schon ein Repolarisationsschritt auf -40 mV ausreichte, um die Kontraktur zu beenden. Auch noch bei einer Repolarisation auf -20 mV erschlaffte die Muskelfaser bis auf eine geringe Restspannung, die bei der Repolarisation auf -90 mV verschwand. Erst eine Repolarisation auf -10 mV hatte keinen Einfluß mehr auf den Verlauf der Kontraktur; die Muskelfaser kehrte innerhalb von etwa einer Minute auf ihren Ruhespannungswert zurück.

Die in Abbildung 3.2 dargestellte Verschiebung der Inaktivierungskurve durch Quin-2 ist nach den bislang durchgeführten Experimenten nicht als charakteristisch für die durch Quin-2 vermittelte Wirkung anzusehen. Die der Kurve zugrunde liegenden Experimente wurden schon kurze Zeit nach Beendigung der Inkubation in Quin-2 durchgeführt. Der typische Quin-2-Effekt trat jedoch erst ungefähr 1 Stunde später auf, wie die weiterführenden Untersuchungen mit Quin-2 an anderen Muskelfasern zeigten (vgl. z.B. Abb. 3.10). Die Verschiebung der in Abbildung 3.2 dargestellten Inaktivierungskurve wurde somit vermutlich nur durch die Ca^{2+} -freie TEA-Lösung, die für die Kontrakturemessungen verwendet wurde, verursacht. Dafür

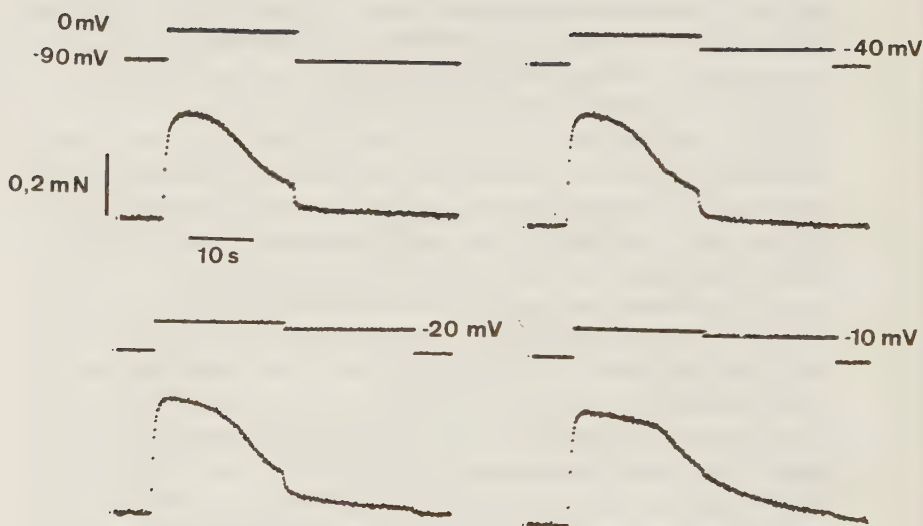


Abb. 3.11 Der Einfluß des Membranpotentials auf die Relaxation der mechanischen Kraft nach Inkubation in Quin-2

Die Kontraktoren wurden an einer Muskelfaser gemessen, die vor Beginn des Experimentes für 60 Minuten in 62 μ M Quin-2-Lösung inkubiert worden war ($T = 6,9^{\circ}\text{C}$, Lsg. F). Die Faser wurde für 20 Sekunden von -90 mV auf 0 mV depolarisiert. Anschließend wurde sie für weitere 20 Sekunden auf ein Zwischenpotential (-40 mV, -20 mV, -10 mV) und dann erst auf -90 mV repolarisiert. Die erste Abbildung links oben stellt die Kontrolle dar. Hier wurde nach Beendigung der Depolarisation sofort wieder auf -90 mV repolarisiert.

spricht auch, daß die dieser Inaktivierungskurve zugrunde liegenden Kontrakturen sehr kurz waren. Dies ist ein charakteristischer Effekt für Ca^{2+} -freie Versuchslösungen (vgl. Abb. 3.8).

3.5 Die Reduktion der Kontraktionsamplitude durch repetitive Reizung an stoffwechselvergifteten Muskelfasern

Wenn Muskelfasern mit niedrigen Frequenzen (0,2 bis 5 Hz) repetitiv gereizt werden, verringert sich die Zuckungshöhe innerhalb von etwa 30 Minuten bis auf ungefähr 20 % des anfänglichen Wertes (EBERSTEIN & SANDOW, 1963). Bei weiterer Reizung der Muskelfaser verschwinden die Kontraktionen gänzlich ("Erschöpfung" oder "Ermüdung" der Faser). Dieser Vorgang läßt sich durch die Verwendung von Stoffwechselgiften wie Cyanid und Monojodessigsäure beschleunigen, wobei Cyanid die oxidative Bereitstellung von Energie hemmt und Monojodessigsäure die Glykolyse blockiert (GRABOWSKI, LOBSIGER & LÜTTGAU, 1972).

An erschöpften Fasern kann die ursprüngliche Zuckungshöhe sowie die maximale Kontrakturspannung durch Zugabe von Coffein, welches Ca -Ionen direkt aus dem sarkoplasmatischen Retikulum freisetzt, wiederhergestellt werden. Aus diesem Grund beruht die Abnahme der Kontraktionshöhe an "ermüdeten" Fasern wahrscheinlich nicht auf einer vollständigen Erschöpfung der Energiereserven und Ca^{2+} -Speicher im Muskel oder auf einem Versagen des kontraktilen Mechanismus. Auch kann eine Veränderung des Aktionspotentials als Ursache für den Effekt ausgeschlossen werden (vgl. GRABOWSKI et al., 1972). Die zuletzt genannten Autoren nahmen auf Grund dieser Ergebnisse an, daß die "Erschöpfung" auf der Verarmung eines zur Kontraktion benötigten Aktivators im tubulären System beruht. Letztlich läßt sich jedoch auch nicht ausschließen, daß die Abnahme der Kontraktionshöhe bei repetitiver Reizung durch Einsetzen des im Rahmen dieser Arbeit zu untersuchenden Inaktivierungsprozesses verursacht wird. Es handelt sich bei der Inaktivierung der mechanischen Kraftentwicklung normalerweise um einen relativ langsamen Vorgang, der erst während längerer

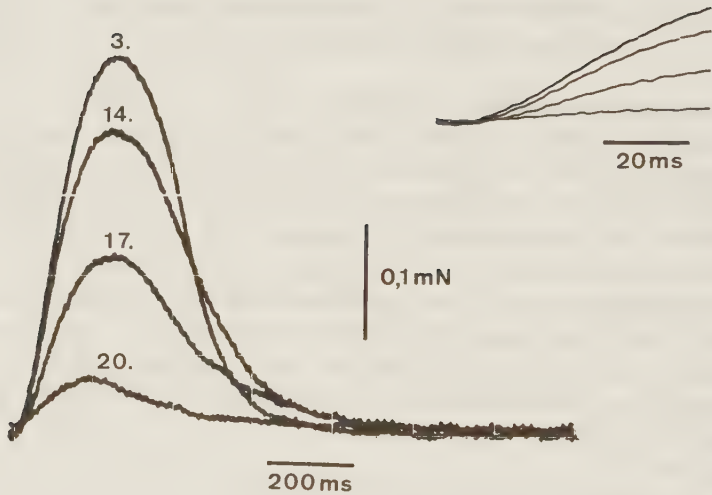


Abb. 3.12 Die Reduktion der Kontraktionshöhe an stoffwechsel-
vergifteten Muskelfasern durch repetitive Reizung

Vor Beginn des Experimentes wurde die Muskelfaser für 60 Minuten in einer Lösung inkubiert, die 2 mM Monojodessigsäure und 2 mM Cyanid enthielt (Lsg. G). Nach dem Einstich der Elektroden wurde die Faser durch repetitive Depolarisationen von -60 mV auf 0 mV "erschöpft" (Pulsdauer 50 ms, Reizfrequenz, 0,2 Hz). Diese "Erschöpfung" führte zu einer Reduktion der Kontraktionskraft, die mit einer starken Abnahme der Anstiegssteilheit einherging (vgl. Ausschnittsvergrößerung des Kontraktionsbeginns). In der Abbildung sind die 3te, 14te, 17te und 20ste Kontraktion dargestellt. Das Experiment wurde bei 6,7°C durchgeführt.

Depolarisation der Membran sichtbar wird. Durch die Erschöpfung der Muskelfaser könnte der Inaktivierungsvorgang beschleunigt werden, so daß er als Ursache für die Abnahme der Kontraktionskraft in Frage käme. Wenn jedoch die Inaktivierung der mechanischen Kraft für die Reduktion der Kontraktionshöhe verantwortlich ist, dann sollte die Aktivierbarkeit der Faser durch eine längere starke Hyperpolarisation wiederhergestellt werden können.

Der 50 %-Wert der normalen Inaktivierungskurve mit 4-minütiger Vorpulsdauer liegt bei etwa -50 mV; bei -60 mV werden noch fast maximale Kontraktionen gemessen (vgl. Abb. 3.1). Eine geringfügige Verschiebung dieser Inaktivierungskurve um wenige Millivolt in negativerer Richtung sollte auch schon bei -60 mV zu einer deutlichen Abnahme der Kontraktionshöhe führen, die bereits durch eine Repolarisation auf -80 mV rückgängig gemacht werden würde. Aus diesem Grunde wurden die Experimente an stoffwechselvergifteten Fasern bei einem Membranpotential von -60 mV durchgeführt. Zuvor wurde der Energiestoffwechsel der Muskelfasern durch eine 60 Minuten dauernde Inkubation in einer Lösung, die 1-2 mM Monojodessigsäure und 2 mM Cyanid enthielt (Lsg. G), vergiftet (ausführliche Beschreibung der Methode der Stoffwechselvergiftung in 2.3.5). Die Experimente begannen mit einer Wartezeit von 5 Minuten bei einem Membranpotential von -60 mV. Anschließend wurde die Faser durch repetitive Depolarisationen (Dauer 50 ms, Frequenz 0,2 Hz) auf 0 mV erschöpft. Dabei nahm die Kontraktionskraft kontinuierlich ab, so daß die Kontrakturamplitude nach 19 bis 38 Kontraktionen nur noch 20 bis 30 % des anfänglichen Wertes betrug (Abb. 3.12). Zu diesem Zeitpunkt wurde die Faser zur Reaktivierung der Kontraktion für 5 Minuten auf -90 mV repolarisiert und anschließend durch 50 ms dauernde Depolarisationen auf 0 mV erneut maximal aktiviert. In drei Experimenten konnten jedoch keine Kontraktionen mehr ausgelöst werden; in zwei Experimenten wurden Kontraktionen sichtbar, die auf weniger als 20 % ihrer anfänglichen Höhe (zu Beginn der Depolarisationen von -60 mV auf 0 mV) reduziert waren und bei weiterer Aktivierung sofort verschwanden. Auch eine Verkürzung oder Verlängerung der Wartezeit bei -90 mV und eine Hyperpolarisation auf -120 mV

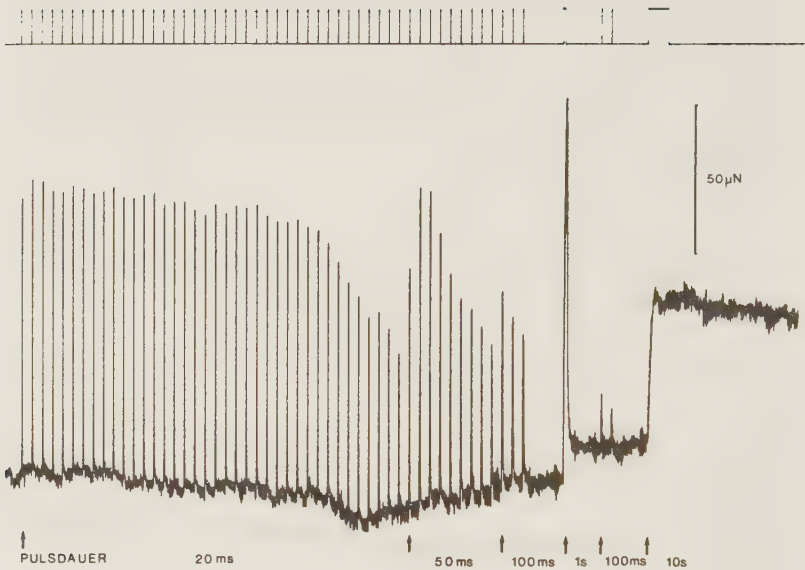


Abb. 3.13 Die Vergrößerung der Kontraktionsamplitude stoffwechselvergifteter Muskelfasern durch eine Verlängerung der Reizdauer

Nach der Vergiftung des Stoffwechsels (60 Minuten in Lsg.G) wurde die Muskelfaser mit einer Frequenz von 0,2 Hz durch 20 ms dauernde Depolarisationen von -60 mV auf 0 mV gereizt. Die durch die "Erschöpfung" verkleinerte Kontraktionsamplitude konnte durch eine Verlängerung der Pulsdauer mehrere Male wieder erhöht werden. Die am Ende des Experiments auftretende Kraftentwicklung der Faser kehrte nicht mehr auf den Ruhespannungswert zurück; die Muskelfaser ging in den Rigorzustand über. In der unteren Spur der Abbildung sind die Kontraktionen dargestellt, die obere Spur verdeutlicht die Pulssequenz. Das Experiment wurde bei 6,9°C in Lösung G durchgeführt.

führten zu keiner Wiederherstellung der Kontraktionskraft. Auf Grund dieser Ergebnisse ist demnach die potentialabhängige Inaktivierung der Kontraktionskraft wahrscheinlich nicht die Ursache für die Verkleinerung der Kontraktionsamplituden bei repetitiver Reizung. Es läßt sich jedoch nicht gänzlich ausschließen, daß die Inaktivierungskurve über -120 mV hinaus in den negativen Potentialbereich verschoben wurde und die mechanische Kraft nur durch praktisch nicht durchführbare, lang andauernde, starke Hyperpolarisationen reaktiviert werden könnte.

Die durch die "Erschöpfung" reduzierte Kontraktionskraft konnte jedoch mehrfach durch eine Verlängerung der Depolarisationsdauer wieder erhöht werden (Abb. 3.13). Dieses Experiment wurde an vier verschiedenen Muskelfasern reproduziert. Es ist somit eine weitere Bestätigung für die Annahme, daß zur mechanischen Aktivität noch ausreichend Stoffwechselenergie vorhanden ist und daß weiterhin auch ein Einfluß auf die Prozesse, die nach der Ca^{2+} -Ausschüttung des sarkoplasmatischen Retikulums ablaufen, als Ursache für den "Ermüdungseffekt" ausgeschlossen werden kann (GRABOWSKI, LOBSIGER & LÜTTGAU, 1972). Es besteht die Möglichkeit, daß eine Verlangsamung der sarkoplasmatischen Ca^{2+} -Freisetzung für die Reduktion der Kontraktionskraft während der repetitiven Reizung verantwortlich ist. Dafür spricht, daß die Anstiegsteilheit der Kontraktionen mit fortschreitender "Erschöpfung" der Muskelfaser stark reduziert wurde (s. Abb. 3.12).

3.6 Die Wiederherstellung der Kontraktionskraft nach vollständiger Inaktivierung der mechanischen Aktivität

Nach einer spontanen Relaxation der mechanischen Kraft befindet sich das kontraktile System in einer Art Refraktärstadium, das als Inaktivierung bezeichnet wird. Das bedeutet, daß durch sofort anschließende erneute Depolarisation keine zweite Kraftentwicklung ausgelöst werden kann. Die Kontraktilität der Muskelfaser wird erst im Verlauf einer mehrere Sekunden dauernden Repolarisation wiederhergestellt ("re-priming", "restoration"). Der "repriming"-Prozeß ist wie die Inaktivierung zeit- und potentialabhängig und kann auch durch

Entzug des extrazellulären Calciums oder durch verschiedene Pharmaka beeinflusst werden (FRANKENHAEUSER & LÄNNERGRÉN, 1967; HEISTRACHER & HUNT, 1969; CAPUTO, 1972.) Die Amplitude der Kontraktur nach einer "repriming"-Phase ermöglicht Rückschlüsse auf den Anteil des kontraktile Systems, der durch Repolarisation aus dem inaktivierten Zustand wieder in den Ruhezustand überführt wurde. "Repriming"-Experimente bilden damit eine wichtige Ergänzung zu Inaktivierungsexperimenten, da sie Hinweise auf die Prozesse liefern, die zur Wiederherstellung der Kontraktionskraft führen, also zur Aufhebung der Inaktivierung. Wegen dieser engen Verbindung von Inaktivierung und "restoration" wurden die im folgenden beschriebenen Experimente durchgeführt.

3.6.1 Die Wiederherstellung der Kontraktionskraft in Ca^{2+} -freier Versuchslösung

Die Substitution des extrazellulären Calciums durch eine äquivalente Konzentration an Mg^{2+} (vgl. Einleitung und 2.3.3) führt zu einer Beschleunigung des Inaktivierungsprozesses. Dies wird durch eine Verkürzung der Kontrakturdauer in Ca^{2+} -freier Lösung und eine Verlagerung der Inaktivierungskurve zu negativeren Membranpotentialen deutlich (vgl. 3.1 u. 3.3). Die Lage der Aktivierungskurve wird unter diesen Versuchsbedingungen dagegen nicht (LÜTTGAU & SPIECKER, 1979) oder nur sehr wenig (COTA & STEFANI, 1981) beeinflusst. Es stellte sich deshalb die Frage, ob in Ca^{2+} -freien Versuchslösungen auch die Wiederherstellung der Kontraktionsfähigkeit von Muskelfasern nach einer vollständigen Inaktivierung verändert ist.

Diese Experimente wurden bei $6,7^{\circ}\text{C}$ in Lösung F (Kontrollexperimente in Lösung E) durchgeführt. Die Muskelfasern wurden zur vollständigen Inaktivierung der Kontraktionskraft für 3 Minuten von -90 mV auf 0 mV depolarisiert und sofort anschließend zur Wiederherstellung der Kraft für verschiedene Zeiten auf -90 mV repolarisiert. Der Grad der wiedererlangten Kontraktilität konnte dann durch eine erneute Depolarisation auf 0 mV ermittelt werden (ausführliche Darstellung von Technik und Auswertung der "repriming"-Experimente in 2.2.3).

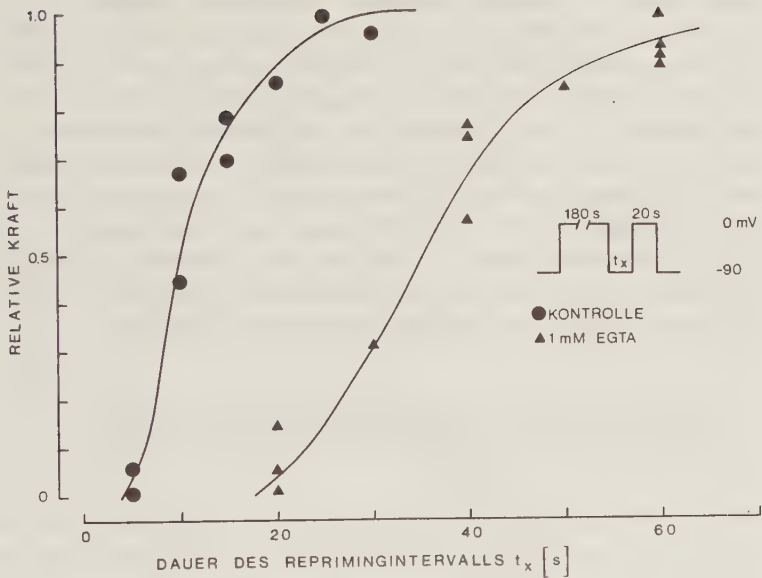


Abb. 3.14 Die Wiederherstellung der Kontraktionsfähigkeit in Ca^{2+} -freier Versuchslösung

Durch den Entzug des extrazellulären Calciums wurde die "repriming"-Kurve in Richtung längerer "repriming"-Intervalle verschoben.

Die Experimente wurden nach der in 2.2.3 beschriebenen Methode durchgeführt und ausgewertet. Das Pulsprogramm für die Versuche wird durch das in die Abbildung eingezeichnete Schema verdeutlicht. Die Kontrollkurve (●) wurde an drei Fasern in Lösung E aufgenommen, die EGTA-Kurve (▲) an vier Fasern in Lösung F. Beide Kurven wurden nach Augenmaß gezeichnet. Auf der Ordinate des Diagramms ist die relative Kraft aufgetragen, auf der Abszisse die Dauer des "repriming"-Intervalls.

$T = 6,7^{\circ}C$.

In Abbildung 3.14 sind "repriming"-Kurven dargestellt, die nach dieser Methode aufgenommen wurden. Wie die Abbildung zeigt, wurde die "repriming"-Kurve in Ca^{2+} -freier Versuchslösung in Richtung längerer "repriming"-Intervalle verschoben. Der Entzug des extrazellulären Calciums verzögert also die Wiederherstellung der mechanischen Kraft. In Kontrolllösung wurde schon nach einer Erholungszeit von 5 Sekunden eine auf 5 % der anfänglichen Amplitude wiederhergestellte Kontraktur ausgelöst. Nach einer "repriming"-Dauer von 20 Sekunden wurden 90 % der maximalen Kraft erreicht. Zu diesem Zeitpunkt trat in Ca^{2+} -freier Versuchslösung erst eine kleine Kontraktur (etwa 5 % der maximalen Spannung) auf. Bis zur vollständigen Wiederherstellung der Kraft wurde eine "repriming"-Dauer von 60 bis 70 Sekunden benötigt.

3.6.2 Untersuchungen zur Temperaturabhängigkeit des "repriming"-Prozesses

"Repriming"-Experimente von verschiedenen Autoren wiesen auf eine starke Temperaturabhängigkeit des "repriming"-Prozesses hin (ADRIAN, CHANDLER & RAKOWSKI, 1972; CAPUTO, BOLAÑOS & GONZALES, 1984). Aus diesem Grunde wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Wiederherstellung der Kontraktionsfähigkeit bei verschiedenen Temperaturen untersucht.

In Abbildung 3.15 sind "repriming"-Kurven dargestellt, die bei drei unterschiedlichen Temperaturen aufgenommen wurden ($6,3^{\circ}\text{C}$; $12,1^{\circ}\text{C}$; $18,5^{\circ}\text{C}$). Die den Kurven zugrunde liegenden Experimente wurden in Lösung E nach der in 3.6.1 beschriebenen Methode durchgeführt. Bei einer Versuchstemperatur von $6,3^{\circ}\text{C}$ konnte eine vollständige Wiederherstellung der Kraft nach einem "repriming"-Intervall von ungefähr 30 Sekunden gemessen werden. Eine Erhöhung der Temperatur führte zu einer Beschleunigung des "repriming"-Prozesses. So wurde bei $12,1^{\circ}\text{C}$ die maximale Kontrakturenspannung schon nach 15 Sekunden wieder erreicht. Bei $18,5^{\circ}\text{C}$ dauerte die vollständige Wiederherstellung der Kraft sogar nur 2 bis 3 Sekunden.

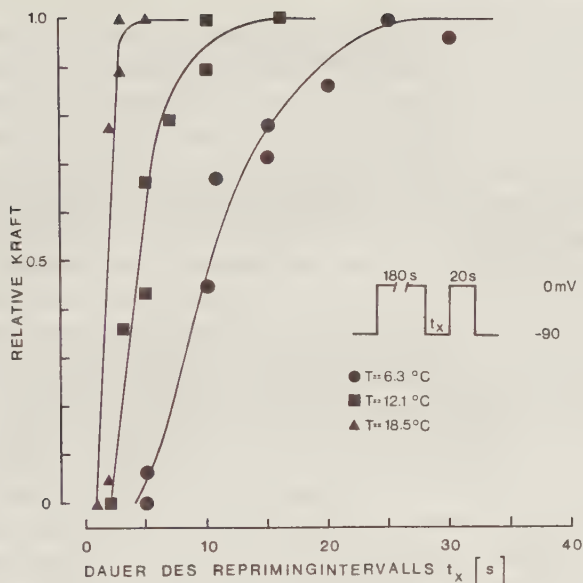


Abb. 3.15 Die Temperaturabhängigkeit des "repriming"-Prozesses

Durch eine Erhöhung der Versuchstemperatur wurde die Wiederherstellung der Kontraktionsfähigkeit nach einer vollständigen Inaktivierung beschleunigt. Die Experimente wurden nach der in 2.2.3 beschriebenen Methode durchgeführt und ausgewertet. Die Graphen wurden nach Augenmaß eingezeichnet. Das Schema in der Abbildung verdeutlicht das Pulsprogramm. Alle drei Kurven wurden in Lösung E aufgenommen und zwar bei $6,3^\circ\text{C}$ (●, drei Fasern), $12,1^\circ\text{C}$ (■, drei Fasern) und $18,5^\circ\text{C}$ (▲, zwei Fasern). Auf der Abszisse des Diagramms ist die Dauer des "repriming"-Intervalls angegeben und auf der Ordinate die relative Kraft.

Da im allgemeinen die Temperaturabhängigkeit von Lebensprozessen durch den Q_{10} beschrieben wird, wurden auch hier die Meßdaten nach der VANT'HOFFSCHEN Reaktionsgeschwindigkeit-Temperatur-Regel ausgewertet:

$$Q_{10} = \frac{k_2}{k_1}^{10/t_2 - t_1}$$

k_2 = Reaktionsgeschwindigkeitskonstante bei der Temperatur t_2

k_1 = Reaktionsgeschwindigkeitskonstante bei der Temperatur t_1

t_2 = höhere Temperatur

t_1 = tiefere Temperatur

Als Maßzahl für die Geschwindigkeitskonstanten k_1 und k_2 wurde die Steigung der jeweiligen "repriming"-Kurve zwischen 10 und 90 % der relativen Kraft verwendet. Die Berechnung nach dieser Formel ergab für den "repriming"-Prozeß folgende Q_{10} -Werte:

t_1	t_2	Q_{10}
6,3 °C	18,5 °C	8,19
6,3 °C	12,1 °C	3,79
12,1 °C	18,5 °C	16,44

Diese Q_{10} -Werte stimmen relativ gut mit den Q_{10} -Berechnungen anderer Autoren überein. CAPUTO und Mitarbeiter (1984) ermittelten für den "repriming"-Prozeß am gleichen Präparat einen Q_{10} von 4 und ADRIAN und Mitarbeiter (1976) am Froschsartoriusmuskel einen Q_{10} von ungefähr 9.

3.6.3 Der Einfluß des Membranpotentials auf die Wiederherstellung der Kontraktionskraft

Der "repriming"-Prozeß, der nach einer Inaktivierung der

mechanischen Kraft einsetzt, ist abhängig von dem Membranpotential der Muskelfaser zu diesem Zeitpunkt (HODGKIN & HOROWICZ, 1960).

Die im folgenden beschriebenen Experimente sollten Aufschluß über den genauen Einfluß des Membranpotentials auf die Kinetik der Wiederherstellung der maximalen Kontrakturspannung geben. Die Untersuchungen wurden bei $6,7^{\circ}\text{C}$ in Lösung E durchgeführt. Zur Messung der in Abbildung 3.16 dargestellten "restoration"-Kurven wurden die Muskelfasern durch eine 3-minütige Depolarisation auf 0 mV vollständig inaktiviert (ausführliche Beschreibung der Methode in 2.2.3). Sofort anschließend wurde zur "restoration" auf unterschiedliche Potentiale hyperpolarisiert (-120 mV , -90 mV , -60 mV). Wie aus der Abbildung 3.16 ersichtlich ist, lief der "repriming"-Prozeß bei einer Hyperpolarisation auf -120 mV schneller ab als bei einer Repolarisation auf -90 mV . Die maximale Kontrakturspannung wurde hier schon nach 5 bis 7 Sekunden wieder erreicht, während dazu bei -90 mV 30 Sekunden benötigt wurden. Zu sehr ungewöhnlichen, nicht einheitlichen Ergebnissen führte die Repolarisation der Muskelfasern auf -60 mV . Gemeinsam war dabei allen Experimenten, daß die Wiederherstellung der mechanischen Kraft bei -60 mV nach deutlich längeren "repriming"-Intervallen (20 bis 30 Sekunden) als bei -90 mV sichtbar wurde. Bei einer Muskelfaser wurde dann innerhalb von 120 Sekunden die maximale Kontrakturamplitude wiederhergestellt. Bei zwei anderen Muskelfasern trat nur eine unvollständige, transiente Wiederherstellung der mechanischen Kraft auf. In diesen Fällen nahm die Kontrakturamplitude bei längeren "repriming"-Intervallen wieder ab, so daß bei einer Muskelfaser nach 2-minütiger Repolarisation auf -60 mV keine Kraft mehr ausgelöst werden konnte. Diese beiden Experimente wurden ebenso wie die maximal wiederhergestellte Kontrakturamplitude nach 2 Minuten bei der anderen Muskelfaser durch eine Kontrollkontraktur am Ende des Versuches abgesichert (vgl. Abb. 3.17). Auch konnte die auffällige transiente Wiederherstellung der mechanischen Kraft noch in einer weiteren Versuchsreihe unter anderen Bedingungen ($T = 0,5^{\circ}\text{C}$; -70 mV "repriming"-Potential) beobachtet werden.

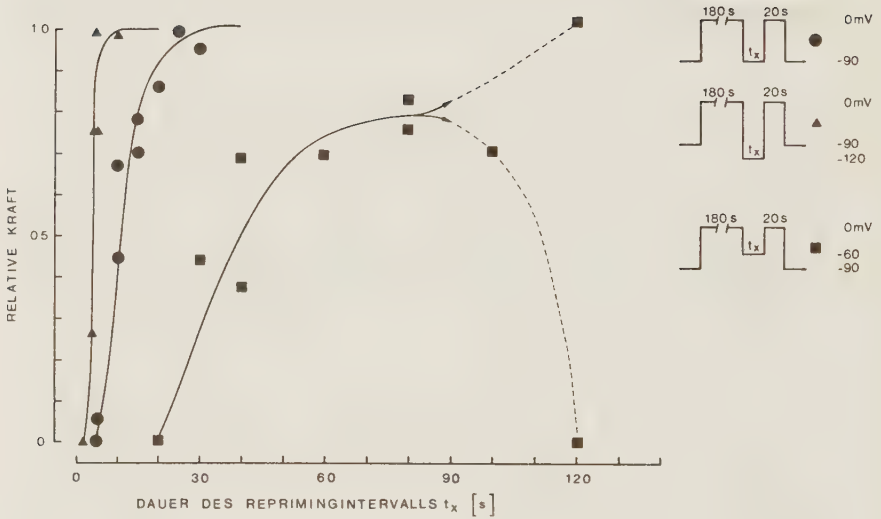


Abb. 3.16 Der Einfluß des Membranpotentials auf die Wiederherstellung der Kontraktionsfähigkeit

Der "repriming"-Prozeß, der nach einer Inaktivierung der mechanischen Kraft einsetzt, war abhängig von dem Membranpotential zu diesem Zeitpunkt. Eine Hyperpolarisation auf -120 mV (▲, drei Fasern) führte zu einer schnelleren Wiederherstellung der Kontraktionsfähigkeit als eine Repolarisation auf -90 mV (●, drei Fasern). Bei einem "repriming"-Potential von -60 mV setzte der "repriming"-Prozeß sehr verzögert ein (■, vier Fasern). Bei einer Muskelfaser erfolgte innerhalb von 2 Minuten dann eine Wiederherstellung der maximalen Kontrakturamplitude, während bei zwei Muskelfasern nur ein unvollständiger und transients "repriming"-Prozeß ablief. Die beiden alternativen Kurvenverläufe bei längeren "repriming"-Pulsen auf -60 mV sind gestrichelt in das Diagramm eingezeichnet. In Abbildung 3.17 sind exemplarisch die Kontrakтураufzeichnungen aus einer Versuchsreihe dargestellt, in welcher die ungewöhnliche transiente Wiederherstellung der Kontraktur bei -60 mV besonders deutlich wurde.

Alle Experimente wurden nach der in 2.2.3 beschriebenen Methode durchgeführt (Lsg. E, 6,7°C) und ausgewertet. Die in die Abbildung eingezeichneten Schemata verdeutlichen das jeweilige Pulsprogramm. Auf der Ordinate des Diagramms ist die relative Kraftentwicklung angegeben und auf der Abszisse die Dauer des "repriming"-Intervalls.

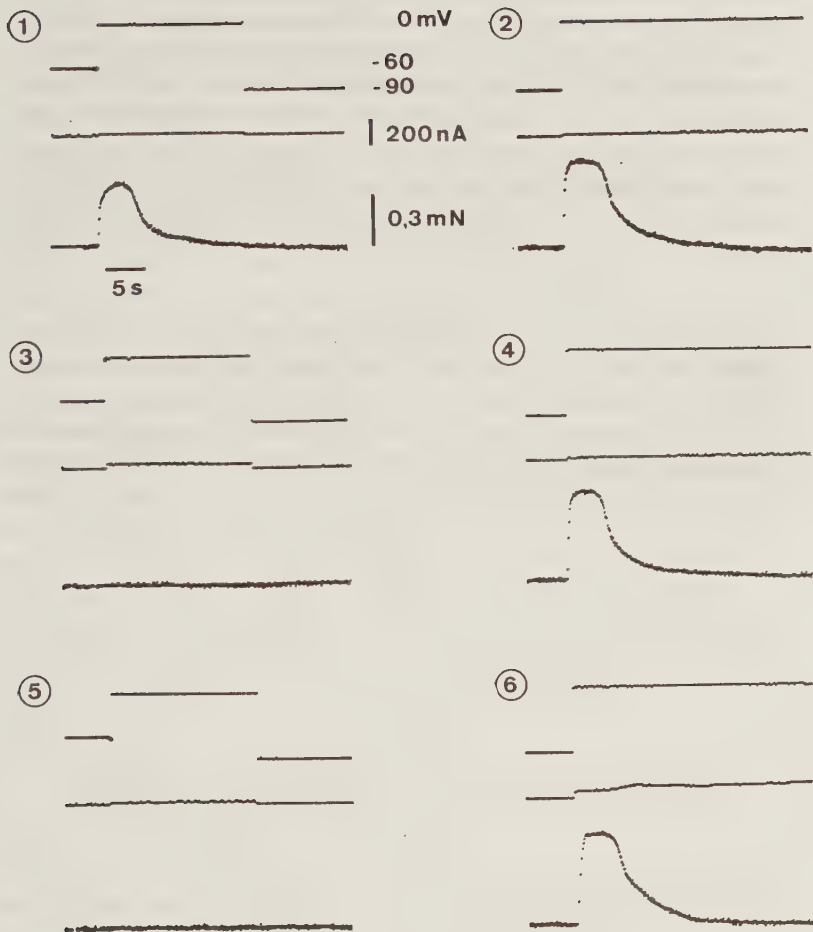


Abb. 3.17 Die transiente Wiederherstellung der Kontraktionsfähigkeit bei einem "repriming"-Potential von -60 mV

Diese Versuchsreihe liegt unter anderem der Abbildung 3.16 zugrunde. Sie wurde an einer Muskelfaser in der oben dargestellten Reihenfolge durchgeführt. Die erste Kontrollkontraktur ist aus Platzgründen nicht abgebildet. Kontraktur 2, 4 und 6 sind die übrigen Kontrollkontrakturen der Versuchsreihe. Kontraktur 1 wurde nach einer 80-sekündigen Repolarisation auf -60 mV gemessen. Aktivierung 3 erfolgte nach einer 20-sekündigen und Aktivierung 5 nach einer 120-sekündigen Repolarisation auf -60 mV. Die Versuchsbedingungen sind in Abbildung 3.16 angegeben.

Aus diesem Grunde wurden in Abbildung 3.16 bei der aus den zuletzt dargestellten Experimenten resultierenden "re-priming"-Kurve zwei alternative Kurvenverläufe bei längeren "repriming"-Intervallen als 80 Sekunden angedeutet. Wahrscheinlich wird also bei längeren Repolarisationen auf Membranpotentiale von etwa -70 mV bis -60 mV kein einheitlicher Zustand im Inaktivierungsverlauf erreicht. So kann entweder eine Wiederherstellung der maximalen Kontrakturamplitude erfolgen oder eine vollständige Inaktivierung der mechanischen Kraft.

Durch eine Verbindung günstiger Versuchsbedingungen konnte in ergänzenden Experimenten der "repriming"-Prozeß weiter beschleunigt werden. So wurde bei einer Versuchstemperatur von 19 °C und Hyperpolarisation auf -120 mV die maximale Kontrakturspannung schon nach einer "repriming"-Dauer von 1 Sekunde wieder erreicht.

4. DISKUSSION

4.1 Inaktivierung, Paralyse und Wiederherstellung der elektromechanischen Kopplung

Die Ergebnisse der in dieser Arbeit dargestellten Experimente sprechen für einen unmittelbaren Einfluß von Ca^{2+} -Ionen auf die Prozesse, die der Inaktivierung der mechanischen Kraft zugrunde liegen. So führt der Entzug des extrazellulären Calciums zu einer Beschleunigung der Inaktivierung und einer Verzögerung der Wiederherstellung der Kontraktionskraft. Möglicherweise werden diese Effekte durch eine Erniedrigung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration verursacht, da ein Entzug des extrazellulären Calciums auch die freie myoplasmatische Ca^{2+} -Konzentration in der Zelle herabsetzt (LÓPEZ et al., 1984). Überraschenderweise kann eine durch andere Versuchsbedingungen herbeigeführte Erniedrigung der freien Ca^{2+} -Konzentration in der Zelle die Inaktivierung auch gegenteilig beeinflussen, wie besonders die Experimente mit dem intrazellulär wirksamen Ca^{2+} -Chelator Quin-2, aber auch die Untersuchungen mit Dantrolen zeigen (ausführliche Diskussion dieser Effekte unter 4.1.4 und 4.2).

4.1.1 Inaktivierung und "restoration" in Ca^{2+} -haltigen Lösungen

Die Inaktivierung des kontraktile Systems wird durch die Inaktivierungskurve charakterisiert (FRANKENHAEUSER & LÄNNERGREN, 1967). Sie zeigt die Abhängigkeit der Aktivierbarkeit einer Muskelfaser bei Depolarisation auf 0 mV von einem vorher an der Membran eingestellten Potential. FRANKENHAEUSER und LÄNNERGREN nahmen an, daß sich das kontraktile System nach einer konditionierenden Depolarisation von 1 Minute Dauer in einem stationären Zustand befindet. Eine unter diesen Bedingungen aufgenommene Inaktivierungskurve ist deshalb identisch mit der nach 1-minütiger Erholungsdauer gemessenen "steady state restoration"-Kurve (HODGKIN & HOROWICZ, 1960).

Durch die vorliegende Arbeit wurden Lage und Verlauf der mit Hilfe der K^+ -Kontraktur-Methode aufgenommenen Inaktivierungskurve von FRANKENHAEUSER und LÄNNERGREN (1967) auch unter "voltage clamp"-Bedingungen bestätigt. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, daß nach 1-minütigem Vorpuls im Inaktivierungsverlauf noch kein stationärer Zustand erreicht ist (vgl. Abb.3.1). Bei einer Verlängerung der konditionierenden Depolarisation von 1 Minute auf 4 Minuten wurde die Inaktivierungskurve weiter in den negativeren Potentialbereich verlagert. Eine Verlängerung der Vorpulsdauer über 4 Minuten hinaus führte zu schlecht reproduzierbaren Versuchsergebnissen, da langandauernde Depolarisationen für die Präparate eine extreme Belastung darstellen. Es kann jedoch davon ausgegangen werden, daß sich das elektromechanische Kopplungssystem auch nach 4-minütigem Vorpuls noch nicht vollständig in einem stationären Zustand befindet. Dafür sprechen die Messungen anderer Autoren zur Zeitabhängigkeit der Inaktivierung von K^+ -Kontrakturen (NAGAI, TAKAUJI, KOSAKA & TSUTSU-URA, 1979). Danach ist die Zeitabhängigkeit der Inaktivierung durch einen zweiphasigen Verlauf charakterisiert (Inaktivierungsphase 1 und Inaktivierungsphase 2). In der ersten Phase der Inaktivierung werden Zeitverlauf und Ausmaß der Inaktivierung durch das Potential der konditionierenden Depolarisation bestimmt. Nach etwa 1 Minute geht der exponentielle Verlauf der Inaktivierung 1 in einen Gleichgewichtszustand über, der um so länger stabil bleibt, je negativer das Potential des konditionierenden Vorpulses vor der Aktivierung war. Bei konditionierenden Depolarisationen auf Potentiale zwischen -65 mV und -55 mV bleibt der Gleichgewichtszustand für mehrere Minuten Vorpulsdauer auf dem durch die Inaktivierungsphase 1 nur geringfügig reduzierten Niveau (auf 95 bis 85 %) erhalten. Erst nach frühestens 12 Minuten (bei einer kond. Depolarisation auf -56 mV) setzt die bis zur vollständigen Inaktivierung führende Inaktivierungsphase 2 ein. Diese zweite Inaktivierungsphase zeigt ebenso wie die Inaktivierung 1 einen exponentiellen, jedoch deutlich langsameren Zeitverlauf. In einem Potentialbereich von -40 bis -65 mV führt die Inaktivierung 2 in jedem Fall bis zur vollständigen Inaktivierung.

Diese Befunde bieten eine Erklärungsmöglichkeit für den Widerspruch zwischen der Annahme eines stationären Zustandes im Inaktivierungsverlauf nach 1-minütigem Vorpuls (FRANKENHAEUSER & LÄNNERGREN , 1967) und der in dieser Arbeit gemessenen Verschiebung der Inaktivierungskurve bei weiterer Verlängerung der konditionierenden Depolarisation. Eine schon nach 1-minütigem Vorpuls aufgenommene Inaktivierungskurve spiegelt nur die schnelle Inaktivierungsphase 1 wider , da die Inaktivierung 2 erst nach mehreren Minuten einsetzt. Dieses lange Verweilen des kontraktile Systems auf dem durch die Inaktivierungsphase 1 herbeigeführten Niveau wurde von FRANKENHAEUSER und LÄNNERGREN als stationärer Zustand im Inaktivierungsverlauf gedeutet. Die Untersuchungen von NAGAI et al. (1979) sprechen dafür, daß unter Normalbedingungen erst im Potentialbereich des Ruhepotentials (negativer als etwa -80 mV) die potential- und zeitabhängige Inaktivierung nicht mehr vorhanden oder vernachlässigbar gering ist. Somit könnte die Inaktivierungskurve durch entsprechend lange konditionierende Depolarisationen maximal bis in den Potentialbereich des Ruhepotentials verschoben werden, also um etwa 40 mV.

Der nach einer Inaktivierung bei Repolarisation einsetzende Prozeß zur Wiederherstellung der Kraft wird ganz entscheidend bestimmt durch das Membranpotential zu diesem Zeitpunkt (HODGKIN & HOROWICZ , 1960). Dieses zeigen auch die Messungen in dieser Arbeit zum Einfluß des Membranpotentials auf den Zeitverlauf des "repriming"-Prozesses (vgl. Abb. 3.16). Bei einer Repolarisation auf -90 mV, einem Potential, das dem Ruhepotential der Muskelfaser entspricht, wurden zur Wiederherstellung der maximalen Kontrakturamplitude ungefähr 30 Sekunden benötigt. Diese Zeit verkürzte sich auf etwa 5 bis 7 Sekunden bei einer Hyperpolarisation auf -120 mV. Dagegen führte eine Repolarisation auf -60 mV zu einer sehr langsamen, und in zwei von drei Experimenten nur zu einer unvollständigen, transienten (Maximalwert der Kurve nach ungefähr 80 Sekunden) Wiederherstellung der Kontraktionsfähigkeit.

HODGKIN und HOROWICZ (1960) untersuchten als erste die Potential- und Zeitabhängigkeit der elektromechanischen Kopplung. Sie erklärten ihre Experimente, indem sie annahmen, daß ein

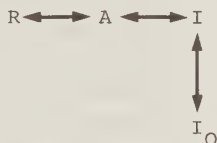
in der T-Tubulismembran lokalisiertes System (Potentialsensor) in noch unbekannter Weise die Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen aus dem SR kontrolliert. Ähnlich wie der Na^{+} -Kanal kann dieses Kopplungssystem in Abhängigkeit von dem Membranpotential und auch von der Zeit drei verschiedene Zustandsformen einnehmen: ruhend (R), aktiviert (A) und inaktiviert (I). Bei sehr negativen Membranpotentialen befindet sich das System überwiegend im Ruhezustand, aus dem heraus durch Depolarisation eine Aktivierung und ein Übergang in den inaktivierten Zustand erfolgen kann. Erst bei Repolarisation findet wieder eine Rückkehr aus dem inaktivierten Zustand in den Ruhezustand statt. Es ist in diesem Zusammenhang von Interesse, daß die intramembranaln Ladungsbewegungen in der T-Tubulismembran (SCHNEIDER & CHANDLER, 1973) eine ähnliche Potentialabhängigkeit wie die Wiederherstellung der mechanischen Kraft zeigen (ADRIAN et al., 1976).

Neuere Untersuchungen weisen darauf hin, daß unter bestimmten Versuchsbedingungen, wie Ca^{2+} -freie Lösung oder Zugabe des Ca^{2+} -Antagonisten D-600, auch noch ein sekundärer, stabiler inaktivierter Zustand existiert (EISENBERG et al., 1983; GRAF & SCHATZMANN, 1984; GOTTSCHALK & LÜTTGAU, 1985). Nach EISENBERG und Mitarbeitern (1983) wird dieser zweite inaktivierte Zustand als "paralysed state" und der Übergang in diesen Zustand als "Paralyse" bezeichnet. Im folgenden soll dieser Zustand durch I_0 gekennzeichnet werden.

Die transiente Wiederherstellung der Kraft bei einem "repriming"-Potential von -60 mV weist darauf hin, daß prinzipiell auch in Ca^{2+} -haltiger Lösung eine Paralyse möglich ist. Vermutlich beginnt in diesen Fällen bei einer Repolarisation auf -60 mV nach einer 3-minütigen Depolarisation auf 0 mV gleichzeitig mit der Rückführung des Kopplungssystems aus dem inaktivierten Stadium in das Ruhestadium auch ein entgegengesetzter Vorgang, nämlich ein langsamer Übergang in den Zustand I_0 . Aufgrund der unterschiedlichen Geschwindigkeiten dieser beiden Vorgänge wird das System in den ersten 80 Sekunden der Repolarisation vorwiegend in das Ruhestadium überführt, wie durch die Zunahme der Aktivierbarkeit zu dieser Zeit deutlich wird (s. Abb. 3.16). Nach etwa 80 Sekunden wird der Anteil des zu Anfang der Repolarisation in den Ruhezustand gebrachten Kopplungssystems durch

Überführung in den Zustand I_0 mehr und mehr verringert. Dies entspricht der Verschiebung der Inaktivierungskurve auf Werte negativer als -60 mV (vgl. 4.1.1, erster Absatz) und damit der Abnahme der Aktivierbarkeit bei längeren Repolarisationszeiten auf -60 mV.

Unter Berücksichtigung der neueren Befunde zur T-SR-Kopplung kann ein einfaches, erweitertes Modell aufgestellt werden, das eine formale Beschreibung der elektromechanischen Kopplung erlaubt:



Ähnliche Modelle wurden schon von HILLE (1977) entwickelt, um die Blockierung des Na^+ -Kanals in der Zellmembran durch Lokalanästhetika zu erklären. Zur Beschreibung weiterer Phänomene führte HILLE zusätzlich noch einen stabilisierten aktivierten Zustand, A_0 , ein, der jedoch bei der Beschreibung der hier zu diskutierenden Versuche entbehrlich ist. Es soll dennoch nicht ausgeschlossen werden, daß zum Beispiel durch Zugabe von Ca^{2+} -Antagonisten in der elektromechanischen Kopplung ein stabiler aktivierter Zustand induziert werden kann (GOTTSCHALK & LÜTTGAU, unveröffentlichte Beobachtungen).

4.1.2 Die Wirkung von Ca^{2+} -freien Lösungen

In allen Experimenten zum Einfluß der extrazellulären Ca-Ionen auf die Kontraktilität einer Muskelfaser ist es notwendig, das entzogene Calcium durch ein anderes, divalentes Kation zu ersetzen. Erst damit wird gewährleistet, daß der Potentialgradient in der Muskelfasermembran unverändert bleibt. Bei Substitution der Ca-Ionen durch Mg-Ionen muß eine 1,5 bis 2-fach höhere Mg^{2+} -Konzentration verwendet werden, um das Oberflächenpotential an der Membranaußenseite konstant zu halten

($1,5 \text{ Mg}^{2+} \triangleq 1 \text{ Ca}^{2+}$, STEFANI & CHIARANDINI, 1973; $2 \text{ Mg}^{2+} \triangleq 1 \text{ Ca}^{2+}$, DÖRRSCHEIDT-KÄFER, 1976; $1,7 \text{ Mg}^{2+} \triangleq 1 \text{ Ca}^{2+}$, COTA & STEFANI, 1982). Da in den Experimenten mit Ca^{2+} -freien Lösungen der vorliegenden Arbeit die freie Ca^{2+} -Konzentration durch eine 1,8-fach höhere freie Mg^{2+} -Konzentration ersetzt wurde (s. 2.3.3), können die Änderungen in der Potentialabhängigkeit der Inaktivierung nicht auf einer Beeinflussung des Potentialgradienten in der Membran durch eine Veränderung der Oberflächenladungen zurückgeführt werden. Es muß sich vielmehr um eine direkte Beeinflussung des Inaktivierungsprozesses in der elektromechanischen Kopplung handeln. Bereits durch K^{+} -Kontrakturmessungen anderer Autoren konnte nachgewiesen werden, daß der Entzug des extrazellulären Calciums nur geringe Auswirkungen auf die Aktivierung der mechanischen Kraft hat, dagegen den Inaktivierungsprozeß stark beschleunigt (LÜTTGAU & SPIECKER, 1979; COTA & STEFANI, 1982). Bei einer Reduktion des extrazellulären Calciums von 10^{-3} auf 10^{-9} M fanden LÜTTGAU und SPIECKER (1979) eine Verschiebung der Inaktivierungskurve um 20 bis 30 mV in den negativen Potentialbereich. Auch COTA und STEFANI (1982) konnten bei Entzug des extrazellulären Calciums eine Verlagerung der Inaktivierungskurve in den negativen Potentialbereich zeigen.

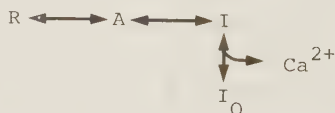
Durch die Untersuchung der vorliegenden Arbeit wurde dieser Effekt prinzipiell auch für die unter "voltage clamp"-Bedingungen aufgenommene Inaktivierungskurve bestätigt (s. Abb.3.2). In Ca^{2+} -freien Lösungen wurde eine Verschiebung der "steady state"-Inaktivierungskurve um etwa -20 mV gemessen. Bei einer Verlängerung des konditionierenden Vorpulses von 1 Minute auf 4 Minuten verstärkte sich dieser Effekt zu einer Verlagerung um -30 mV. Die Inaktivierungskurve dient als ein Indikator für die Inaktivierungskinetik der elektromechanischen Kopplung einer Muskelfaser. Demnach kann die bei Entzug des extrazellulären Calciums auftretende Verschiebung der Inaktivierungskurve in einen negativeren Potentialbereich gedeutet werden als eine Beschleunigung des Inaktivierungsverlaufes. Diese Annahme wird durch K^{+} -Kontrakturuntersuchungen zur Zeitabhängigkeit der Inaktivierung gestützt (NAGAI et al., 1979).

Danach konnte in Ca^{2+} -armen Lösungen (0,18 mM Ca^{2+}) eine vollständige Inaktivierung der mechanischen Kraft schon nach einer 4-minütigen Depolarisation auf -65 mV erzielt werden. In Ca^{2+} -haltiger Lösung wurde dagegen selbst nach einem 15 Minuten dauernden Vorpuls auf -65 mV nur eine sehr geringe Inaktivierung der mechanischen Kraft sichtbar (auf ca. 95 %).

Bereits LÜTTGAU und SPIECKER (1979) nahmen an, daß in Ca^{2+} -freier Lösung auch der intrazelluläre Ca^{2+} -Spiegel im Sarkoplasma nahe der Membran sinkt und daß die Ca^{2+} -Konzentration an dieser Stelle für den Ablauf der Kontraktion entscheidend ist (s. a. SPIECKER, 1980). Diese Vermutung der Autoren stützt sich auf die Ergebnisse von Inaktivierungsexperimenten mit Pharmaka, die erwiesenermaßen die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration beeinflussen. Eine ähnliche Beschleunigung der Inaktivierung und Verschiebung der Inaktivierungskurve wie in Ca^{2+} -freier Lösung wurde nach Zugabe von Dantrolen gemessen, das die Ca^{2+} -Konzentration im Sarkoplasma senkt (DESMEDT & HAINAUT, 1977; TAKAUJI & NAGAI, 1977). Die Zugabe von Coffein, welches die freie intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration erhöht, verschob die Inaktivierungskurve dagegen zu positiveren Potentialen (LÜTTGAU & OETLIKER, 1968). Ein direkter Nachweis zum Einfluß von extrazellulären Ca-Ionen auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration gelang LÓPEZ et al. (1984) durch Messungen mit Ca^{2+} -sensitiven Elektroden. Danach führt der Entzug des extrazellulären Calciums zu einer Herabsetzung der freien myoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration von $1,2 \times 10^{-7}$ M auf 4×10^{-8} M. Es sprechen demnach eine Reihe von Befunden dafür, daß die Beschleunigung der Inaktivierung in Ca^{2+} -freier Lösung nur indirekt durch den Entzug des extrazellulären Calciums vermittelt wird. Die direkte Ursache ist vermutlich eine Verarmung von Ca-Ionen an einer für die Inaktivierung der mechanischen Kraft kritischen Stelle in der Zelle (s. 4.1.3 Modelle zur Interpretation der Rolle von Ca-Ionen in der elektromechanischen Kopplung).

Zur Erklärung der Wirkung von Ca^{2+} -freien Lösungen auf die Potentialabhängigkeit der Inaktivierung wird angenommen, daß der in der T-Tubulusmembran lokalisierte Sensor für die Kontraktionsaktivierung eine potentialabhängige Bindungsstelle für Calcium besitzt, mit

einer hohen Affinität bei sehr negativen Membranpotentialen (vgl. 4.1.3.2). Eine Depolarisation führt unter diesen Annahmen zu einer Lockerung der Bindung und einer von der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration abhängigen Abdissoziation des Calciums. Mit dieser Abdissoziation geht das System in den paralyisierten Zustand über. Bei einer Erniedrigung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, z.B. nach Eliminierung des Calciums aus der extrazellulären Lösung sollte es unter den hier dargelegten Bedingungen zu einer beschleunigten Abdissoziation und damit auch zu einem schnelleren Eintritt der Paralyse kommen.



Mit diesen Annahmen können auch die Experimente zur Wiederherstellung der Kontraktionsfähigkeit in Ca^{2+} -freier Lösung erklärt werden. Bei Entzug des extrazellulären Calciums verlief der "repriming"-Prozeß langsamer (Abb. 3.14). In Ca^{2+} -haltiger Lösung konnte die maximale Kraft innerhalb einer 30 Sekunden dauernden Repolarisation wiederhergestellt werden, während dazu in Ca^{2+} -freier Lösung fast 70 Sekunden erforderlich waren. Zum Erreichen der halbmaximalen Kraft wurden in Ca^{2+} -freier Lösung sogar viermal längere Zeiten benötigt als in Ca^{2+} -haltiger Lösung. Anscheinend findet bei der 3-minütigen Depolarisation auf 0 mV zur vollständigen Inaktivierung in Ca^{2+} -freier Lösung ein partieller Übergang des Kontrollsystems aus dem inaktivierten Stadium in den Zustand I_O statt. Der im Zustand I_O befindliche Anteil des Kopplungssystems kehrt bei Repolarisation auf -90 mV nur relativ langsam in den Ruhezustand zurück.

Überraschend verliefen die Experimente zur Zeitabhängigkeit der Inaktivierung in Ca^{2+} -freier Versuchslösung (Abb. 3.7). Legt man die in Abbildung 3.2 dargestellten Inaktivierungskurven zugrunde, so sollte eine 1-minütige Depolarisation auf -50 mV in Ca^{2+} -freier Versuchslösung zu einer vollständigen Inaktivierung der mechanischen Kraft führen. Dies war jedoch erst nach

mehreren Aktivierungen in Ca^{2+} -freier Versuchslösung der Fall. Die ersten Meßpunkte der Abbildung 3.7 entsprachen den Inaktivierungskurven, die nach 1- und 4-minütiger Depolarisation auf -50 mV in Ca^{2+} -haltiger Lösung gemessen wurden (vgl. Abb. 3.2). Erst die Messungen nach der vierten Inaktivierung waren mit den Inaktivierungskurven in Ca^{2+} -freier Lösung zu vereinbaren (s. Abb. 3.2). Vermutlich wirkte sich bei diesem Experiment der Entzug des extrazellulären Calciums erst nach längerer Verweildauer und mehreren Aktivierungen in der Ca^{2+} -freien Lösung auf die elektromechanische Kopplung aus. Dies spricht für eine unterschiedliche Empfindlichkeit der einzelnen Muskelfasern gegenüber Ca^{2+} -Entzug. In jedem Fall zeigt dieses Experiment jedoch, daß unter bestimmten Versuchsbedingungen eine äußerst schnelle Inaktivierung der mechanischen Kraft induziert werden kann. Der letzte Meßpunkt (12) in Abbildung 3.7 wurde nach einem 5 Sekunden dauernden Vorpuls aufgenommen. Vermutlich hätten jedoch auch noch kürzere Depolarisationen auf -50 mV eine vollständige Inaktivierung der mechanischen Kraft verursacht. Die fortschreitende Beschleunigung der Inaktivierung während des Experimentes kommt auch zum Ausdruck in den von Aktivierung zu Aktivierung immer kürzer werdenden Kontrollkontraktionen. Dies spricht dafür, daß die 5 Minuten dauernde Repolarisation auf -90 mV vor Aufnahme der Kontrollkontraktur nur ausreicht, um die maximale Kontrakturamplitude wiederherzustellen, nicht aber den ursprünglichen Kontrakturverlauf. Ein vergleichbares Phänomen wird auch bei "repriming"-Experimenten beobachtet. So deutet ein Vergleich der beiden vor und nach einer Hyperpolarisation ausgelösten Kontraktionen darauf hin, daß die maximale Amplitude der Kontraktur früher wiederhergestellt wird, als der gesamte Zeitverlauf der Kontraktur (HODGKIN & HOROWICZ, 1960; CAPUTO et al., 1984; eigene Beobachtungen). Aus diesen Gründen sollte zukünftig zumindest bei der Auswertung einiger Experimente sowohl die maximale Amplitude als auch das Integral der Kraftaufzeichnung berücksichtigt werden.

4. 1.3 Modelle zur Interpretation der Rolle von Ca-Ionen bei der elektromechanischen Kopplung

Ein erstes Modell zur Beteiligung von Ca-Ionen an der elektromechanischen Kopplung wurde bereits in der Einleitung mit der "trigger"-Ca²⁺-Hypothese (e.G. FRANK, 1982) vorgestellt. Dabei wurde auch auf die Schwachstellen dieses Modells hingewiesen. So wird in der "trigger"-Ca²⁺-Hypothese die Potentialabhängigkeit des Ca²⁺-Freisetzungsmechanismus nicht genügend berücksichtigt (vgl. Einleitung). In neuerer Zeit wurden auf der Basis der "charge movement"-Hypothese zwei weitere Modelle zur Funktion von Ca-Ionen in der T-SR-Kopplung entwickelt (GRAF & SCHATZMANN, 1984; LÜTTGAU, GOTTSCHALK & BERWE, 1986). Das Modell von GRAF und SCHATZMANN benötigt keine erniedrigte intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration, während das andere Modell von einer Herabsetzung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration in Ca²⁺-freier Lösung ausgeht.

4.1.3.1 Die Beeinflussung der "charge movement" durch direkte Bindung von Ca-Ionen

Untersuchungen am Säugermuskel von GRAF und SCHATZMANN zeigten, daß in Ca²⁺-freier Lösung nur eine maximale K⁺-Kontraktur ausgelöst werden konnte. Dieser Effekt war auch bei erneuter Zugabe von Ca-Ionen nicht reversibel. Die Autoren entwickelten dazu ein Modell, nach dem Ca-Ionen an diejenigen geladenen Strukturen gebunden sind, die sich als Potentialsensoren in der T-Tubulusmembran befinden (s. Abb. 4.1). Diese Moleküle liegen im Ruhezustand der Muskelfaser in der T-Tubulusmembran an der cytoplasmatischen Seite und werden durch Depolarisation an die entgegengesetzte Seite verschoben. Bei einer langandauernden Depolarisation in Ca²⁺-freier Lösung können die an die Kopplungsmoleküle gebundenen Ca-Ionen in den Extrazellulärraum diffundieren. Dies führt zu einem Verlust der positiven Ladung der Kopplungsmoleküle und bewirkt eine schnellere Überführung der Moleküle in den inaktivierten Zustand an der cytoplasmatischen Seite der T-Tubulusmembran. Dies verursacht die experimentell gefundene Verkürzung des Kon-

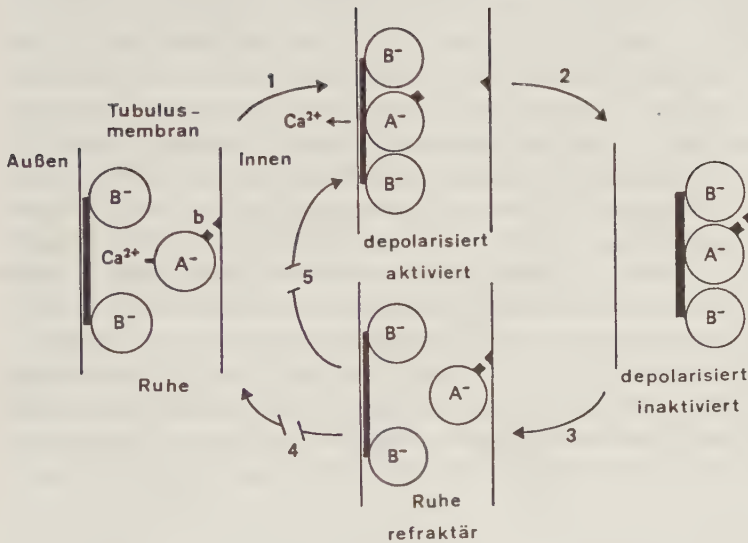


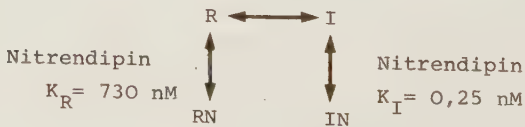
Abb. 4.1 Ein Modell zur Beteiligung der extrazellulären Ca^{2+} -Ionen an den Ladungsbewegungen in der T-Tubulusmembran

In diesem Modell von GRAF und SCHATZMANN (1984) kommen die positiven Ladungen der "charge movement"-Hypothese (vgl. Abb. 1.1) durch Bindung von Ca^{2+} -Ionen an die Moleküle A^- zustande. Bei Depolarisation der T-Tubulusmembran bewegen sich die $(ACa)^+$ -Komplexe in der T-Tubulusmembran von der cytoplasmatischen an die tubuläre Seite. Dieser Vorgang führt zu einer Ausschüttung von Ca^{2+} -Ionen aus den Terminalzisternen des SR. Der Ca^{2+} -Freisetzungsmechanismus wird inaktiviert, wenn der negativ geladene Komplex BB das Molekül $(ACa)^+$ wieder in die Ausgangsposition zurückbringt. Bei längerer Depolarisation in Ca^{2+} -freier Lösung können die an die Struktur A^- gebundenen Ca^{2+} -Ionen in den Extrazellulärraum diffundieren (1). Dadurch kann der Übergang in den Zustand "depolarisiert, inaktiviert" schneller und schon bei geringeren Depolarisationen erfolgen (2). Befindet sich das Molekül A^- an der cytoplasmatischen Seite der T-Tubulusmembran, ist eine erneute Bindung von extrazellulären Ca^{2+} -Ionen nicht möglich, selbst wenn der Versuchslösung wieder Ca^{2+} -Ionen zugesetzt werden. Somit kann bei Depolarisation keine Aktivierung mehr erfolgen (4, 5).

trakturplateaus. Solange sich ein Kopplungsmolekül an der dem SR zugewandten Seite der T-Tubulummembran befindet, ist eine erneute Anbindung sowohl extra- wie intrazellulärer Ca^{2+} -Ionen unmöglich. Wegen der fehlenden positiven Ladungen (Ca^{2+}) kann folglich durch eine weitere Depolarisation keine Aktivierung mehr induziert werden. Das System bleibt im Refraktärstadium, selbst wenn wieder Ca^{2+} -Ionen der Extrazellulärlösung beigelegt werden. Dieses als "Ruhe, refraktär" bezeichnete Stadium ist vergleichbar mit dem Zustand I_0 der vorliegenden Arbeit. Damit werden jedoch auch sofort die Schwachstellen des oben dargestellten Modells sichtbar. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen deutlich, daß auch in Ca^{2+} -haltiger Lösung eine Paralyse stattfinden kann. Weiterhin kann mit der Theorie von GRAF und SCHATZMANN nicht erklärt werden, daß eine Wiederherstellung der Kontraktilität nach einer Paralyse in Ca^{2+} -freier Lösung möglich ist (Temperaturerhöhung, EISENBERG et al., 1983; Hyperpolarisation, GOTTSCHALK & LÜTTGAU, 1985).

4.1.3.2 Die potentialabhängige Bindung von Ca^{2+} -Ionen an das Kontrollsystem in der T-Tubulummembran

BEAN (1984) entwickelte ein Modell, um die Wirkung des Ca^{2+} -Antagonisten Nitrendipin auf den Ca^{2+} -Kanal am Herzmuskel zu erklären. Danach erfolgt die Bindung von Nitrendipin mit einer hohen Affinität an den inaktivierten Ca^{2+} -Kanal und mit einer sehr geringen Affinität an den im Ruhezustand befindlichen Ca^{2+} -Kanal.



Diese Darstellung, die auf einem Modell von HILLE (1977) zur Beschreibung der spannungsabhängigen Blockierung des Na^+ -Kanals durch Lokalanästhetika beruht, kann in modifizierter Form auch die Funktion von Ca-Ionen in der T-SR-Kopplung erklären: An das Kopplungssystem in der T-Tubulismembran sind potentialabhängig Ca-Ionen gebunden. Dabei ist die Affinität zwischen Ca-Ionen und Kopplungssystem groß bei negativen Membranpotentialen; sie verringert sich mit zunehmender Depolarisation, so daß dann die Ca-Ionen in das Myoplasma abdissoziieren können. Der Verlust von Ca-Ionen verursacht einen Übergang des Kontrollsystems aus dem inaktivierten Stadium in den Zustand I_0 . Erst nach einer Repolarisation der Membran können wieder Ca-Ionen aus dem Myoplasma an das Kontrollsystem in der T-Tubulismembran gebunden werden (s. a. 4.1.1).

Mit diesem Modell sind viele experimentelle Befunde der vorliegenden Arbeit in Einklang zu bringen. Anders als in dem Modell von GRAF und SCHATZMANN bietet sich auch eine anschauliche Erklärung für die Möglichkeit, eine Paralyse durch Hyperpolarisation rückgängig machen zu können (GOTTSCHALK & LÜTTGAU, 1985).

4.1.4 Die Wirkung von Quin-2

Quin-2 ist ein intrazellulär wirksamer Ca^{2+} -Chelator, der sich in seiner Grundstruktur auf EGTA zurückführen läßt (s. 2.3.4). Durch die experimentelle Verwendung von Quin-2 kann eine Herabsetzung der freien myoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration an weitgehend intakten Fasern erzielt werden (TSIEN, 1981). Da eine Senkung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration vermutlich Inaktivierung und Paralyse der mechanischen Kraft beschleunigt (vgl. 4.1.2), sollte auch Quin-2 einen ähnlichen, möglicherweise noch ausgeprägteren Effekt als Ca^{2+} -freie Lösungen zeigen. Neben der die Ca^{2+} -Konzentration senkenden Wirkung muß auch die Pufferwirkung von Quin-2 berücksichtigt werden. Auch diese müßte zu einer beschleunigten Inaktivierung der mechanischen Kraft führen, da Quin-2 eine mit Parvalbumin vergleichbare Ca^{2+} -Affinität besitzt und somit den Effekt des

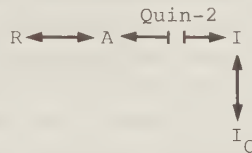
Parvalbumin verstärken müßte (K_a für Parvalbumin $6,7 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, POTTER et al., 1977; K_a für Quin-2 $8,7 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, TSIEN, 1981). Parvalbumin dient an den Zuckungsfasern der Wirbeltiere als Zwischenspeicher für die Ca-Ionen vor der Wiederaufnahme in das SR und ermöglicht damit die schnelle Relaxation der Kraftentwicklung (GILLIS & GERDAY, 1977).

Bei den Experimenten mit Quin-2 trat jedoch ein den Erwartungen genau entgegengesetzter Effekt auf. Quin-2 verursachte eine ausgeprägte Hemmung, in vielen Fällen sogar eine vollständige Blockierung der spontanen Relaxation (vgl. Abb. 3.9 und 3.10 und 3.11). Ein ähnlicher Effekt wurde auch bei Injektion von EGTA registriert, das ebenso wie Quin-2 eine Senkung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration vermitteln sollte (NEUHAUS, 1984). Interessanterweise setzte der Quin-2-Effekt nicht sofort nach Beendigung der 60-minütigen Inkubation in Quin-2-Lösung ein, sondern erst etwa weitere 60 Minuten später (Abb. 3.10). Dabei wurde anscheinend die Ausprägung des Quin-2-Effektes durch wiederholte Aktivierungen der betroffenen Faser beschleunigt. Ein vergleichbares Phänomen wurde bei Blockierung des Na^+ -Kanals an Nervenfasern durch einige Lokalanästhetika beobachtet (use-dependent-block, COURTNEY, 1975). In diesem Fall konnten nur die intrazellulär applizierten Pharmaka an den Na^+ -Kanal binden (FRAZIER et al., 1970), und zwar nicht im Ruhezustand, sondern nur während einer Aktivierung durch längere Depolarisation (STRICHARTZ, 1973).

Bei der Diskussion des Quin-2-Effektes muß davon ausgegangen werden, daß diese Substanz die Aufrechterhaltung einer relativ hohen Ca^{2+} -Konzentration im Myoplasma während einer Depolarisation verlängert (vgl. z.B. Abb. 2.1 und 3.9). Im Extremfall (s. Abb. 3.9) mußte während der gesamten Depolarisationsdauer (3 Minuten) die Ca^{2+} -Konzentration in der Zelle annähernd auf dem zur maximalen Kraftentwicklung benötigten Niveau gehalten werden. NEUHAUS (1984) erwog als Ursache für die Verlangsamung der Kontrakturrelaxation bei EGTA-Injektion eine Hemmung der Ca^{2+} -Pumpe am SR, wodurch eine Wiederaufnahme der freigesetzten Ca-Ionen verhindert würde. Diese Erklärung kann

jedoch für den Quin-2-Effekt als alleiniger Grund ausgeschlossen werden, da eine Repolarisation der Muskelfaser in allen Experimenten mit Quin-2 zumindest zu einer partiellen Relaxation der Kontraktionen führte (vgl. Abb. 3.11). Vermutlich ist die Hauptursache für die Quin-2-Wirkung in einer direkten Beeinflussung des in der T-Tubulusmembran ablaufenden Kopplungsprozesses zu sehen.

In dem "charge movement"-Modell (CHANDLER et al., 1976b) wird die spontane Relaxation der mechanischen Kraft durch eine Immobilisierung der aktivierenden Ladungen beschrieben (vgl. Einleitung, Abb. 1.1). Die hier vorgestellten Ergebnisse können befriedigend erklärt werden, wenn angenommen wird, daß dieser Schritt durch Quin-2 blockiert wird:



Da die Ladungsträger während der Zeit der Depolarisation somit im aktivierten Zustand verbleiben, wird die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR nicht unterbrochen. Erst die Repolarisation der Muskelfaser veranlaßt eine Rückführung der Ladungsträger aus dem aktivierten Zustand in den Ruhezustand und damit eine Beendigung der sarkoplasmatischen Ca^{2+} -Ausschüttung.

Die langandauernden Kontraktionen durch Quin-2 (s. Abb.3.9) zeigen, daß eine Muskelzelle prinzipiell sowohl eine genügende Konzentration an Ca-Ionen im SR als auch ausreichende Energiereserven besitzt, um über mehrere Minuten eine fast maximale Kraftentwicklung aufrecht erhalten zu können. Dabei gibt die 3 Minuten dauernde Kontraktur in Abbildung 3.9 nicht den oberen Grenzwert für die maximale Dauer einer Kraftentwicklung an. Vermutlich hätten auch noch länger dauernde Kontraktionen ausgelöst werden können. Die nach einer Depolarisationsdauer von etwa 40 Sekunden einsetzende relativ langsame Abnahme der

maximalen Kontrakturamplitude (Abb. 3.9) kann möglicherweise darauf zurückgeführt werden, daß durch Quin-2 auch die Ca^{2+} -Pumpe am SR beeinflußt wurde.

4.2 Die Wirkung von Dantrolen auf die elektromechanische Kopplung

Na-Dantrolen ist ein synthetisches Hydantoinderivat, das die freie myoplasmatische Ca^{2+} -Konzentration in der Zelle drastisch reduziert (HAINAUT & DESMEDT, 1974). Diese Verringerung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration wird auch als Ursache für die Wirkung von Dantrolen auf den Inaktivierungsprozeß angesehen. Nach Untersuchungen von TAKAUJI und NAGAI (1977) führt die Zugabe von Dantrolen zu einer deutlichen Beschleunigung der mechanischen Inaktivierung, sichtbar in einer Verkürzung des Kontrakturplateaus und in einer Verlagerung der Inaktivierungskurve um 10 mV in den negativeren Potentialbereich. Fast alle Experimente mit Na-Dantrolen, so auch die Messungen von HAINAUT und DESMEDT (1974) und von TAKAUJI und NAGAI (1977) wurden bei höherer Versuchstemperatur (20 bis 22°C, 37°C) durchgeführt. Darauf ist vermutlich zurückzuführen, daß eine temperaturabhängige Wirkung von Na-Dantrolen, wie sie bei den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit beobachtet wurde, bislang nicht bekannt war. So konnte eine Beschleunigung der Inaktivierung durch Dantrolen nur für eine höhere Versuchstemperatur bestätigt werden. Bei niedriger Versuchstemperatur wirkte Dantrolen hemmend auf die Inaktivierung der mechanischen Kraft (vgl. Abb. 3.5 und 3.6). Die Ursache dieses Effektes konnte mit den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden. Es liegen keine Anhaltspunkte über den Einfluß von Dantrolen auf die freie intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration bei niedriger Versuchstemperatur vor. Somit kann nicht ausgeschlossen werden, daß Dantrolen nur bei höherer Versuchstemperatur zu einer Reduktion und bei niedriger Versuchstemperatur eher zu einer Erhöhung der freien intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt.

DANKO und Mitarbeiter führten Untersuchungen am isolierten SR und an Membranfraktionen des T-Tubulus zur Wirkung von Dantrolen auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration durch. (DANKO, KIM, SRETER & IKEMOTO, 1985). Danach wird die Art des Einflusses von Dantrolen auf die Ca^{2+} -Konzentration in der Zelle durch den Mechanismus bestimmt, der jeweils die Ca^{2+} -Freisetzung induziert. So hemmt Dantrolen die Coffein-induzierte Ca^{2+} -Freisetzung, hat aber keinen Effekt auf die Calcium-induzierte Ca^{2+} -Freisetzung. Besonders kompliziert ist die Wirkung von Dantrolen auf die Depolarisations-induzierte Ca^{2+} -Freisetzung. Hier erfolgt in den ersten Minuten nach Dantrolenzugabe eine im Vergleich zur Kontrollösung reduzierte Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR. Nach ungefähr 4 Minuten nimmt dann die Menge der sarkoplasmatischen Ca^{2+} -Ausschüttung zu, bis fast auf das Doppelte des in Kontrollösung gemessenen Wertes. DANKO und Mitarbeiter nahmen an, daß dieser Wirkungsmechanismus von Dantrolen durch eine Bindung an unterschiedliche Rezeptorentypen verursacht wird. So existieren Bindungsrezeptoren für Dantrolen sowohl am SR als auch am T-Tubulus. Dabei können bei den Rezeptoren am T-Tubulus in Bezug auf die Kinetik der Rezeptorbesetzung mit Dantrolen zwei verschiedene Rezeptortypen unterschieden werden: ein langsam bindender und ein schnell bindender Typ.

Als Fazit dieser Untersuchungen ergibt sich, daß der Wirkungsmechanismus von Dantrolen durch verschiedene Faktoren bestimmt wird. So kann Dantrolen sowohl extrazellulär (T-Tubulus) als auch intrazellulär (SR) binden, wobei für eine extrazelluläre Bindung zwei verschiedene Rezeptorentypen existieren. Es besteht demnach die Möglichkeit, daß die in vorliegender Arbeit gemessenen Dantroleneffekte auf einer temperaturabhängigen Bindung an unterschiedliche Rezeptorentypen beruhen.

Außer Dantrolen sind noch weitere Ca^{2+} -Antagonisten durch eine komplizierte, temperaturabhängige Wirkung gekennzeichnet, so auch das in dieser Arbeit schon häufig erwähnte Verapamilderivat D-600. Nach EISENBERG und Mitarbeitern (1983) führt D-600 nur bei niedriger Versuchstemperatur zu einer Paralyse. Dieser

Effekt ist reversibel bei Temperaturerhöhung. EISENBERG und Mitarbeiter (1983) sahen die Ursache in einer temperaturabhängigen Geschwindigkeitskonstanten für die Bindung von D-600 an seine Bindungsstellen, so daß D-600 bei hoher Versuchstemperatur beschleunigt von den Rezeptoren ablösen kann.

4.3 Spielt der Inaktivierungsprozeß bei der "Erschöpfung" stoffwechselvergifteter Muskelfasern eine Rolle?

Durch die Zugabe von Coffein läßt sich an "erschöpften" Muskelfasern (2.3.5 und 3.5) die ursprüngliche Zuckungshöhe sowie die maximale Kontrakturspannung wiederherstellen (GRABOWSKI, LOBSIGER & LÜTTGAU, 1972). Damit kann eine Verarmung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher und eine Erschöpfung der zur Kraftentwicklung benötigten Stoffwechselenergie als Ursache für den Ermüdungseffekt ausgeschlossen werden. Auch die Aktionspotentiale zeigen keine drastische Veränderung, so daß auch damit nicht das völlige Verschwinden der Aktivierbarkeit nach repetitiver Reizung an stoffwechselvergifteten Fasern erklärt werden kann (GRABOWSKI et al., 1972). In jedem Fall muß also an "erschöpften" Muskelfasern ein Prozeß in der elektromechanischen Kopplung blockiert werden, der zeitlich gesehen nach der Erregung der T-Tubulusmembran, jedoch vor der sarkoplasmatischen Ca^{2+} -Ausschüttung liegt. Prinzipiell könnte demnach die Reduktion der Zuckungsamplitude bei repetitiver Reizung durch den Prozeß verursacht werden, der für die Inaktivierung der mechanischen Kraft verantwortlich ist. Aus diesem Grunde wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch einige Untersuchungen an stoffwechselvergifteten Fasern durchgeführt. (s. 3.5). Die Ergebnisse dieser Experimente zeigten:

1. Die reduzierte Kontraktionsamplitude an erschöpften Fasern kann selbst durch längere Wartezeiten auf hyperpolarisierenden Potentialen (15 Min auf -120 mV) nicht einmal partiell wiederhergestellt werden. Demnach kann mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, daß die "Erschöpfung" auf einer Veränderung der Potentialabhängigkeit der Inaktivierung in Richtung negativerer Potentiale beruht. Der Prozeß, der zur Inaktivierung der mechanischen

Kraft führt, verursacht also nicht auch die "Erschöpfung" der Muskelfaser.

2. Eine durch repetitive Reizung reduzierte Zuckung ist durch eine starke Abnahme der Anstiegssteilheit sowie durch eine Verlangsamung der Relaxation gekennzeichnet (s. Abb. 3.12).
3. Eine vorübergehende Vergrößerung der reduzierten Zuckung kann durch Verlängerung der Pulsdauer erreicht werden (s. Abb. 3.13).

Die unter 2. aufgezeigten Befunde sind ein möglicher Hinweis darauf, daß an "ermüdeten" Fasern ein energieabhängiger Prozeß in der T-SR-Kopplung gehemmt wird. Dabei könnte es sich um die Synthese eines Stoffes handeln, dessen Konzentration in irgendeiner Form die Menge der sarkoplasmatischen Ca^{2+} -Ausschüttung bestimmt. In ähnlicher Form wurde diese Möglichkeit bereits von GRABOWSKI, LOBSIGER und LÜTTGAU (1972) als Ursache für die "Erschöpfung" erwogen. Dabei könnte es sich um das Inositol-1,4,5-trisphosphat (InsP_3) handeln, das bei verschiedenen Zellen nach Hormoneinwirkung aus der Oberflächenmembran freigesetzt wird und in der Lage ist, Ca -Ionen aus intrazellulären Speichern freizusetzen (eine ausführliche Übersicht dieser Vorgänge findet sich bei BERRIDGE & IRVINE, 1985). Bei einer Aktivierung dieses Phosphatidyl-Systems wird Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PtdIns (4,5) P_2) zu Inositol-1,4,5-trisphosphat und Diacylglycerol (DG) hydrolysiert. Sowohl bei DG als auch bei InsP_3 handelt es sich um intrazelluläre Botenstoffe. DG verbleibt in der Plasmamembran und aktiviert eine membranassoziierte Proteinkinase, die C-Kinase. InsP_3 ist wasserlöslich und könnte durch Diffusion schnell die cytoplasmatischen Ca^{2+} -Speicher erreichen. Der eigentlich energieabhängige Schritt dieses Zyklus ist der Aufbau und die Aufrechterhaltung von PtdIns (4,5) P_2 . Hierzu wird ein ständiger Nachschub von ATP benötigt. Dieser Schritt kann daher auch durch Stoffwechselgifte gehemmt werden. Aus diesem Grund könnte auch die in meiner Arbeit angewandte Methode der Stoffwechselvergiftung einen Energiemangel verursachen, durch den die Resynthese von PtdIns (4,5) P_2 gehemmt wird. Dies würde auch die abnehmende Anstiegssteilheit der Zuckungen an "erschöpften" Muskelfasern erklären.

Die Beteiligung eines Phosphatidylinositol-Metabolismus an der Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern konnte bislang für die verschiedensten Gewebe nachgewiesen werden, ist jedoch als Kopplungsglied zwischen T-Tubulus und SR am Skelettmuskel zur Zeit noch umstritten (SUEMATSU, HIRATA, HASHIMOTO & KURIYAMA, 1984; VERGARA & TSIEN, 1985; VOLPE, SALVIATI, DI VIRGILIO & POZZAN, 1985).

Zu einem interessanten Ergebnis führten die Experimente zur Temperaturabhängigkeit des "repriming"-Prozesses. Hierbei zeigte sich, daß die Geschwindigkeit, mit der die Kontraktionsfähigkeit nach einer vollständigen Inaktivierung wiederhergestellt wird, in ausgeprägter Weise von der Temperatur abhängt. So wurde bei einer Erhöhung der Versuchstemperatur von etwa 6 auf 18°C die zur Wiederherstellung der maximalen Kontrakturamplitude benötigte Zeit von 25 auf 2 bis 3 Sekunden verkürzt (s. Abb. 3.15). Die Q_{10} -Berechnungen aus den Steigungen der "repriming"-Kurven ergaben Werte von etwa 8, 4 und 16. Diese ungewöhnlich hohen Q_{10} -Werte stehen in gutem Einklang mit den Befunden anderer Autoren (vgl. 3.6.2). Eine überzeugende Erklärung für dieses Phänomen konnte bisher nicht gefunden werden. Die Analyse wird dadurch erschwert, daß nicht die intramembranaln Ladungsverschiebungen oder die Ca^{2+} -Freisetzung sondern die Kraftentwicklung, d.h. das letzte Glied in einer Verkettung von Vorgängen als Meßgröße diente. Möglich erscheint, daß auch der in der T-Tubulusemembran ablaufende primäre "repriming"-Prozeß selbst aus mehreren voneinander abhängigen Teilschritten besteht.

4.4 Schlußfolgerungen

Es war Thema dieser Arbeit, den Einfluß von Ca-Ionen auf die Inaktivierung der mechanischen Kraft näher zu charakterisieren. Durch einen Vergleich der Experimente in Ca^{2+} -haltiger und Ca^{2+} -freier Lösung konnte gezeigt werden, daß die Ca-Ionen an einem für die Inaktivierung der mechanischen Kraft entscheidenden Schritt in der T-SR-Kopplung beteiligt sind. Bei diesem Schritt handelt es sich vermutlich um den Übergang aus einem ersten inaktivierten Zustand (I) in einen zweiten inaktivierten Zustand (I_0). Durch den Entzug von Ca-Ionen aus dem Kopplungssystem wird dieser auch normalerweise in Ca^{2+} -haltiger Lösung ablaufende Prozeß stark beschleunigt. Dabei spricht vieles dafür, daß die Ca-Ionen potentialabhängig an das Kopplungssystem gebunden sind und nur bei einer längeren Depolarisation der T-Tubulismembran in das Myoplasma diffundieren können.

Die physiologische Bedeutung der Inaktivierung liegt wahrscheinlich in erster Linie in einer Schutzfunktion der Zelle. Es ist anzunehmen, daß im Ruhezustand der Muskelzelle die Inaktivierungskurve viel weiter im negativen Potentialbereich liegt als die durch Aktivierung (kond. Vorpuls) experimentell ermittelte Inaktivierungskurve. Durch eine Inaktivierungskurve im Bereich des Ruhepotentials kann verhindert werden, daß spontane und unterschwellige Erregungen der Zellmembran zu einer Ca^{2+} -Freisetzung oder sogar zu einer Kraftentwicklung führen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Eine Skelettmuskelfaser antwortet auf eine Depolarisation unter isometrischen Bedingungen mit einer phasischen Kraftentwicklung. Einer schnellen Aktivierung folgt nach wenigen Sekunden maximaler Kraft eine spontane Erschlaffung. Das die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum und damit die Kontraktionsaktivierung kontrollierende System in der T-Tubulusemembran (Potentialsensor) geht in einen refraktären oder inaktiven Zustand über, der durch eine Repolarisation wieder rückgängig gemacht werden kann (repriming, restoration). Das System kehrt in den ruhenden, aber aktivierbaren Zustand zurück. Die zuerst mit K^+ -Depolarisationen untersuchte Potential- und Zeitabhängigkeit des Inaktivierungs- bzw. "repriming"-Prozesses wurde in der vorliegenden Arbeit an kurzen Zehenmuskelfasern des Frosches unter "voltage clamp"-Bedingungen bestätigt und weiter analysiert.

Die Potentialabhängigkeit der Inaktivierung wurde mit konditionierenden Vorpulsen unterschiedlicher Dauer untersucht. Bei einer Pulsdauer von 1 Min wurden erste Anzeichen von Inaktivierung bei Werten negativer als -50 mV beobachtet; vollständige Inaktivierung trat bei etwa -30 mV ein. Eine Verlängerung der Pulsdauer auf 4 Min verschob die Potentialabhängigkeit der Inaktivierung um etwa 12 mV in Richtung negativer Werte.

Die Geschwindigkeit, mit der die Kontraktionsfähigkeit nach einer vollständigen Inaktivierung wiederhergestellt wurde, war abhängig von dem Potential während der Repolarisation. Bei einer Repolarisation auf -90 mV erfolgte eine Wiederherstellung der maximalen Kontraktionsfähigkeit innerhalb von 30 Sekunden. Diese Zeit wurde bei einer Hyperpolarisation auf -120 mV auf 5 Sekunden herabgesetzt.

Die Wiederherstellung der Kontraktionskraft nach einer vollständigen Inaktivierung zeigte eine ausgeprägte Temperaturabhängigkeit mit einem Q_{10} -Wert von etwa 9.

Ein Ersatz des extrazellulären Calciums durch eine äquivalente Menge an Magnesium führte zu einer Beschleunigung der Inaktivierung und zu einer verlangsamten Wiederherstellung der Kontraktionsfähigkeit. Die Potentialabhängigkeit der Inaktivierung verschob sich im Vergleich zu den Normalbedingungen um 20 bzw. 30 mV (kond. Pulse von 1 Min bzw. 4 Min) in Richtung negativerer Werte.

Zur Erklärung der Ca^{2+} -Entzugsphänomene wurde angenommen, daß das die Ca^{2+} -Freisetzung kontrollierende System (Potential-sensor) in einen sekundären inaktiven Zustand (Paralyse) übergeht, bedingt durch eine potentialabhängige Ca^{2+} -Abdissoziation von Bindungsstellen an diesem System.

Zur Prüfung der Frage, ob eine Erniedrigung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration die Inaktivierung beschleunigt, wurden eine Reihe von Versuchen mit zwei Substanzen durchgeführt, von denen bekannt ist, daß sie eine Erniedrigung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration bewirken.

Na-Dantrolen, ein medizinisch verwendetes Hydantoinderivat, verursachte bei hohen Temperaturen (19°C) die erwartete Beschleunigung der Inaktivierung, verbunden mit einer Verschiebung der Inaktivierungskurve zu negativeren Werten. Bei 7°C kehrte sich der Effekt jedoch um; es kam zu einer Verlangsamung der Inaktivierung.

Zugabe des intrazellulär wirksamen Ca^{2+} -Chelators Quin-2 führte zu lang dauernden Kontrakturen, die über Minuten anhielten und mit einer Hemmung des Inaktivierungsprozesses erklärt wurden. Die widersprüchlichen Ergebnisse mit beiden Substanzen, welche keine eindeutige Schlußfolgerung erlauben, wurden z.T. auf sekundäre Effekte zurückgeführt.

Abschließend wurde geprüft, ob die bei Stoffwechselvergiftung beobachtete Abnahme der Kraftentwicklung bei kurzzeitigen Depolarisationen auf einer Beschleunigung des Inaktivierungsprozesses beruht. Die unter dieser Annahme bei einer Hyperpolarisation zu erwartende Wiederherstellung der Zuckungshöhe trat nicht

auf. Die Abnahme der Zuckungshöhe beruhte auf einer deutlichen Verlangsamung der Aktivierung, sodaß eine Verlängerung der Pulsdauer zu einer weitgehenden Regeneration der Kontraktion führte.

6. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- ADRIAN, R.H. (1956): The effect of internal and external potassium concentration on the membrane potential of frog muscle. *J. Physiol.* 133, 631-658
- ADRIAN, R.H. & ALMERS, W. (1976): Charge movement in the membrane of striated muscle. *J. Physiol.* 254, 339-360
- ADRIAN, R.H., CHANDLER, W.K. & RAKOWSKI, R.F. (1976): Charge movement and mechanical repriming in skeletal muscle. *J. Physiol.* 254, 607-644
- ADRIAN, R.H. & RAKOWSKI, R.F. (1978): Reactivation of membrane charge movement and delayed potassium conductance in skeletal muscle fibres. *J. Physiol.* 278, 533-557
- ADRIAN, R.H. & PERES, A. (1979): Charge movement and membrane capacity in frog muscle. *J. Physiol.* 289, 83-97
- ASHLEY, C.C. & RIDGWAY, E.B. (1970): On the relationships between membrane potential, calcium transient and tension in single barnacle muscle fibres. *J. Physiol.* 209, 105-130
- BAYLOR, S.M., CHANDLER, W.K. & MARSHALL, M.W. (1983): Sarcoplasmic reticulum calcium release in frog skeletal muscle fibres estimated from Arsenazo III calcium transients. *J. Physiol.* 344, 625-666
- BEAN, B.P. (1984): Nitrendipine block of cardiac calcium channels: High-affinity binding to the inactivated state. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 6388-6392
- BERRIDGE, M.J. & IRVINE, R.F. (1984): Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature, Lond.* 312, 315-321
- BERWE, D. & FELDMAYER, D. (1984): Investigations of force restoration in short toe muscle fibres under voltage clamp control. *Pflügers Arch.* 402, R 46
- BIANCHI, C.P. & SHANES, A.M. (1959): Calcium influx in skeletal muscle at rest, during activity and potassium contracture. *J. gen. Physiol.* 42, 803-815
- BIANCHI, C.P. (1968): Pharmacological actions on excitation-contraction coupling in striated muscle. *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 27, 126-131
- BIANCHI, C.P. (1969): Pharmacology of excitation-contraction coupling in muscle. Introduction statement of the problem. *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 28, 1624-1628

- BIANCHI, C.P. (1979): Regulation of aerobic metabolism of frog skeletal muscle by calcium, cyclic GMP and cyclic AMP. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 22, 285-287
- CAMPBELL, K.P., FRANZINI-ARMSTRONG, C. & SHAMOO, A.E. (1980): Further characterization of light and heavy sarcoplasmic reticulum vesicles. Identification of the "sarcoplasmic feet" associated with heavy sarcoplasmic vesicles. *Biochim. biophys. Acta* 602, 97-116
- CAPUTO, C. & GIMENEZ, M. (1967): Effects of external calcium deprivation on single muscle fibers. *J. gen. Physiol.* 50, 2177-2195
- CAPUTO, C. (1972): The effect of low temperature on the excitation-contraction coupling phenomena of frog single muscle fibres. *J. Physiol.* 223, 461-482
- CAPUTO, C. & DE BOLAÑOS, P.F. (1979): Membrane potential, contractile activation and relaxation rates in voltage clamped short muscle fibres of the frog. *J. Physiol.* 289, 175-189
- CAPUTO, C., BOLAÑOS, P. & GONZALES, G.F. (1984): Effect of membrane polarization on contractile threshold and time course of prolonged contractile responses in skeletal muscle fibers. *J. gen. Physiol.* 84, 927-943
- CHANDLER, W.K., RAKOWSKI, R.F. & SCHNEIDER, M.F. (1976a): A non-linear voltage dependent charge movement in frog skeletal muscle. *J. Physiol.* 254, 245-283
- CHANDLER, W.K., RAKOWSKI, R.F. & SCHNEIDER, M.F. (1976b): Effects of glycerol treatment and maintained depolarization on charge movement in skeletal muscle. *J. Physiol.* 254, 285-316
- COTA, G. & STEFANI, E. (1982): External calcium and contractile activation during potassium contractures in twitch muscle fibres of the frog. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 60, 513-523
- COURTNEY, K.R. (1975): Mechanism of frequency-dependent inhibition of sodium currents in frog myelinated nerve by the lidocaine derivative GEA 968. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 195, 225-236
- DANKO, S., KIM, D.H., SRETER, F.H. & IKEMOTO, N. (1985): Inhibitors of calcium release from the isolated sarcoplasmic reticulum. II. The effects of dantrolene on Ca^{2+} release induced by caffeine, Ca^{2+} and depolarization. *Biochim. Biophys. Acta* 775, 320-327
- DE MELLO, W.C. (1973): Membrane sealing in frog skeletal muscle fibers. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 70, 982-984
- DESMEDT, J.E. & HAINAUT, K. (1977): Inhibition of the intracellular release of calcium by dantrolene in barnacle giant muscle fibres. *J. Physiol.* 265, 565-585

- DÖRRSCHEIDT-KÄFER, M. & PUSCH, H. (1975): A surface charge model describing the effects of Ca^{2+} , Mg^{2+} and H^+ on the contraction threshold of frog skeletal muscle fibres. *Pflügers Arch.* 359, R72
- DÖRRSCHEIDT-KÄFER, M. (1976): The action of Ca^{2+} , Mg^{2+} and H^+ on the contraction threshold of frog skeletal muscle. *Pflügers Arch.* 362, 33-41
- EBERSTEIN, A. & SANDOW, A. (1963): Fatigue mechanisms in muscle fibres. In: *The Effect of Use and Disuse on Neuromuscular Functions*, pp. 515-526. Prague
- ECKER, A. (1896): *Anatomie des Frosches: Lehre vom Skelett und vom Muskelsystem*. 3. Aufl., neubearb. von E. Gaupp. Vieweg, Braunschweig
- EISENBERG, B.R. & GILAI, A. (1979): Structural changes in single muscle fibers after stimulation at a low frequency. *J. gen. Physiol.* 74, 1-16
- EISENBERG, B.R. & EISENBERG, R.S. (1982): The T-SR junction in contracting single skeletal muscle fibers. *J. gen. Physiol.* 79, 1-19
- EISENBERG, R.S., MCCARTHY, R.T. & MILTON, R.L. (1983): Paralysis of frog skeletal muscle fibres by the calcium antagonist D-600. *J. Physiol.* 341, 495-505
- ELLIS, K.O. & BRYANT, S.H. (1972): Excitation-contraction coupling in skeletal muscle by dantrolene sodium. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmacol.* 274, 107-109
- ELLIS, K.O. & CARPENTER, J.F. (1972): Studies on the mechanism of action of dantrolene sodium. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmacol.* 275, 83-94
- ENDO, M. (1966): Entry of fluorescent dyes into the sarco-tubular system of the frog muscle. *J. Physiol.* 185, 224-238
- ENDO, M., TANAKA, M. & OGAWA, Y. (1970): Calcium induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned muscle fibres. *Nature, Lond.* 228, 34-36
- FABIATO, A. (1983): Calcium induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am. J. Physiol.* 245: (Cell. Physiol. 14:) C1-C14
- FORD, L.E. & PODOLSKY, R.J. (1970): Regenerative calcium release within muscle cells. *Science, N.Y.* 167, 58-59
- FRANK, G.B. (1958): Inward movement of calcium as a link between electrical and mechanical events in contraction. *Nature, Lond.* 183, 1800-1801
- FRANK, G.B. (1960): Effects of changes in extracellular calcium concentration on the potassium-induced contraction of frog's skeletal muscle. *J. Physiol.* 151, 518-538

- FRANK, G.B. (1978a): Rapid loss of the twitch of frog's skeletal muscle fibres in $O-Ca^{++}$ bicarbonate buffered Ringer's solution. *Life Sci.* 22, 1077-1082
- FRANK, G.B. (1978b): Antagonism by phosphate buffer of the twitch loss in isolated muscle fibers produced by calcium-free solutions. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 56, 523-526
- FRANK, G.B. (1979): Surface membrane bound calcium is the main source of trigger calcium for excitation-contraction coupling in vertebrate skeletal muscle fibers. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 22, 309-319
- FRANK, G.B. (1980): Commentary: The current view of the source of trigger calcium in excitation-contraction coupling in vertebrate skeletal muscle. *Biochem. Pharmacol.* 29, 2399-2406
- FRANK, G.B. (1982): Roles of extracellular and trigger calcium ions in excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 60, 427-439
- FRANKENHAEUSER, B. & LÄNNERGREN, J. (1967): The effect of calcium on the mechanical response of single twitch muscle fibres of *Xenopus laevis*. *Acta physiol. scand.* 69, 242-254
- FRANZINI-ARMSTRONG, C. (1970): Studies of the triad. I-Structure of the junction in frog twitch fibers. *J. Cell Biol.* 47, 488-499
- FRANZINI-ARMSTRONG, C. & NUNZI, G. (1983): Junctional feet and particles in the triads of a fast-twitch muscle fibre. *J. Muscle Research Cell Motility* 4, 233-252
- FRAZIER, D.T., NARAHASHI, T. & YAMADA, M. (1970): The site of action and activate form of local anesthetics. Experiments with quaternary compounds. *J. Pharmac. Exp. Ther.* 171, 45-51
- GILLIS, J.M. & GERDAY, C. (1977): Calcium movement between myofibrils, parvalbumins and sarcoplasmic reticulum in muscle. In *Calcium-binding Proteins and Calcium Function* (edited by WASSERMAN, R.M., CORRADINO, R.A., CARAFOLI, E., KRETZINGER, R.H., MACLENNAN, D.H. and SIEGEL, F.L.), pp. 193-196. New York: North Holland.
- GILLIS, J.M., THOMASON, D., LEFÈVRE, J. & KRETSINGER, R.H. (1982): Parvalbumins and muscle relaxation: a computer simulation study. *J. Muscle Research Cell Motility* 3, 377-398
- GILLY, W.R. & HUI, C.S. (1980): Voltage-dependent charge movement in frog slow muscle fibres. *J. Physiol.* 301, 157-173
- GOTTSCHALK, G. (1979): Untersuchungen zur elektromechanischen Kopplung an kurzen Muskelfasern. Diplomarbeit, Abteilung Biologie der Ruhr-Universität Bochum

- GOTTSCHALK, G. (1984): "Voltage clamp"-Untersuchungen zu elektrischen und mechanischen Parametern kurzer Muskelfasern des Frosches. Dissertation, Abteilung für Biologie der Ruhr-Universität Bochum
- GOTTSCHALK, G. & LÜTTGAU, H.Ch. (1985): The effect of D600 and Ca deprivation on force kinetics in short toe muscle fibres of the frog. *J. Physiol.* 371, 170P
- GRABOWSKI, W., LOBSIGER, E.A. & LÜTTGAU, H.Ch. (1972): The effect of repetitive stimulation at low frequencies upon the electrical and mechanical activity of single muscle fibres. *Pflügers Arch.* 334, 222-239
- GRAF, F. & SCHATZMANN, H.J. (1984): Some effects of removal of external calcium on pig striated muscle. *J. Physiol.* 349, 1-13
- HAINAUT, K. & DESMEDT, J.E. (1974): Effect of dantrolene sodium on calcium movements in single muscle fibres. *Nature, Lond.* 252, 728-730
- HASSELBACH, W. & MAKINOSE, M. (1961): Die Calciumpumpe der "Erschlaffungsgrana" des Muskels und ihre Abhängigkeit von der ATP-Spaltung. *Biochem. Z.* 339, 94-111
- HEISTRACHER, P. & HUNT, C.C. (1969): Contractile repriming in snake twitch muscle fibres. *J. Physiol.* 201, 613-626
- HILLE, B., WOODHULL, A.M. & SHAPIRO, B.I. (1975): Negative surface charge near sodium channels of nerve: divalent ions, monovalent ions and pH. *Phil. Trans. B*, 270, 301-318
- HILLE, B. (1977): Local anesthetics: Hydrophilic and hydrophobic pathways for the drug-receptor reaction. *J. gen. Physiol.* 69, 497-515
- HODGKIN, A.L. & HOROWICZ, P. (1959): The influence of potassium and chloride ions on the membrane potential of single muscle fibres. *J. Physiol.* 148, 127-160
- HODGKIN, A.L. & HOROWICZ, P. (1960): Potassium contractures in single muscle fibres. *J. Physiol.* 153, 386-403
- HOROWICZ, P. & SCHNEIDER, M.F. (1981): Membrane charge moved at contraction threshold in skeletal muscle fibres. *J. Physiol.* 314, 595-633
- HUANG, C.L.-H. (1982): Pharmacological separation of charge movement components in frog skeletal muscle. *J. Physiol.* 324, 375-387
- HUI, C.S. (1982): Pharmacological dissection of charge movement in frog skeletal muscle fibers. *Biophys. J.* 39, 119-122

- HUI, C.S. (1983a): Pharmacological studies of charge movement in frog skeletal muscle. *J. Physiol.* 337, 509-529
- HUI, C.S. (1983b): Differential properties of two charge components in frog skeletal muscle. *J. Physiol.* 337, 531-552
- HUI, C.S., MILTON, R.L. & EISENBERG, R.S. (1983): Elimination of charge movement in skeletal muscle by a calcium antagonist. *Biophys. J.* 41, 178a
- HUXLEY, H.E. (1964): Evidence for continuity between the central elements of the triads and extracellular space in frog sartorius muscle. *Nature, Lond.* 202, 1067-1071
- JOHNSON, J.D., CHARLTON, S.C. & POTTER, J.D. (1979): A fluorescence stopped flow analysis of Ca^{2+} exchange with troponin C. *J. Biol. Chem.* 254, 3497-3502
- JOHNSON, J.D., ROBINSON, D.E., ROBERTSON, S.P., SCHWARTZ, A. & POTTER, J.D. (1981): Ca^{++} exchange with troponin and the regulation of muscle contraction. In: Regulation of muscle contraction: Excitation-contraction coupling. Ed. Grinnell, A.D. & Brazier, M.A.B., Academic Press, New York. 241-259
- LÓPEZ, J.R., ALAMO, L., CAPUTO, C., DIPOLO, R. & VERGARA, J. (1983): Determination of ionic calcium in frog skeletal muscle fibers. *Biophys. J.* 43, 1-4
- LÜTTGAU, H.C. (1963): The action of calcium ions on potassium contractures of single muscle fibres. *J. Physiol.* 168, 679-697
- LÜTTGAU, H.C. & OETLIKER, H. (1968): The action of caffeine on the activation of the contractile mechanism in striated muscle fibres. *J. Physiol.* 194, 51-74
- LÜTTGAU, H.Ch. & SPIECKER, W. (1979): The effects of calcium deprivation upon mechanical and electrophysiological parameters in skeletal muscle fibres of the frog. *J. Physiol.* 296, 411-429
- LÜTTGAU, H.Ch., GOTTSCHALK, G. & BERWE, D. (1986): The role of Ca^{2+} in inactivation and paralysis of excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Fortschr. Zool.* in Vorbereitung
- MACLENNAN, D.H. & WONG, P.G. (1971): Isolation of a calcium-sequestering protein from sarcoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 68, 1231-1235
- MACLENNAN, D.H. & HOLLAND, P.C. (1975): Calcium transport in sarcoplasmic reticulum. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 4, 377-404

- NAGAI, T., TAKAUJI, M., KOSAKA, I. & TSUTSU-URA, M. (1979): Biphasic time course of inactivation of potassium contractions in single twitch muscle fibers of the frog. *Jap. J. Physiol.* 29, 539-549
- NEUHAUS, R. (1984): Untersuchungen zur Kraftentwicklung kurzer Skelettmuskelfasern unter voltage-clamp nach EGTA-Injektion. Diplomarbeit, Abteilung für Biologie der Ruhr-Universität Bochum
- NICOLA SIRI, L., SÁNCHEZ, J.A. & STEFANI, E. (1980): Effect of glycerol treatment on the calcium current of frog skeletal muscle. *J. Physiol.* 305, 87-96
- PAGE, S. (1964): The organization of the sarcoplasmic reticulum in frog muscle. *J. Physiol.* 175, 10-11P
- POTTER, J.D. & GERGELY, J. (1975): The calcium and magnesium binding sites of troponin and their role in the regulation of myofibrillar adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* 250, 4628-4633
- POTTER, J.D., HSU, F.J. & POWNALL, H.J. (1977): Thermodynamics of Ca^{2+} -binding to troponin-C. *J. Biol. Chem.* 252, 2452-2454
- PUTNEY, V.W. & BIANCHI, C.P. (1974). Site of action of dantrolene in frog sartorius muscle. *J. Pharmac. exp. Ther.* 189, 202-212.
- RAKOWSKI, R.F. (1981): Immobilization of membrane charge in frog skeletal muscle by prolonged depolarization. *J. Physiol.* 317, 129-148
- ROSENFELD, S.S. & TAYLOR, E.W. (1985a): Kinetic studies of calcium binding to regulatory complexes from skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 260, 252-261
- ROSENFELD, S.S. & TAYLOR, E.W. (1985b): Kinetic studies of calcium and magnesium binding to troponin C. *J. Biol. Chem.* 260, 242-251
- SANDOW, A. (1952): Excitation-contraction coupling in muscular response. *Yale J. Biol. Med.* 25, 176-201
- SCHARFF, O. (1979): Comparison between measured and calculated concentrations of calcium ions in buffers. *Anal. Chim. Acta* 109, 291-306
- SCHNEIDER, M.F. & CHANDLER, W.K. (1973): Voltage dependent charge movement in skeletal muscle: a possible step in excitation-contraction coupling. *Nature, Lond.* 242, 244-246
- SCHNEIDER, M.F. & HOROWICZ, P. (1979): Membrane charge movement at contraction thresholds in skeletal muscle. *Biophys. J.* 25, 201a

- SCHNEIDER, M.F. (1981): Membrane charge movement and depolarization-contraction coupling. *A. Rev. Physiol.* 43 507-517
- SNYDER, H.R., Jr., DAVIS, C.S., BICKERTON, R.K. & HALLIDAY, R.P. (1967): 1- (5-Arylfurfurylidene) amino Hydantoins. A new class of muscle relaxants. *J. Med. Chem.* 10, 807-810
- SOMLYO, A.V. (1978): Membrane bridges across the triadic gap after tannic acid fixation. *Biophys. J.* 21, 56a
- SOMLYO, A.V. (1979): Bridging structures spanning the junctional gap at the triad of skeletal muscle. *J. Cell Biol.* 80, 743-750
- SPIECKER, W. (1976): Untersuchungen über die Rolle von Ca-Ionen in der elektromechanischen Kopplung von Skelettmuskelfasern. Diplomarbeit, Abteilung Biologie der Ruhr-Universität Bochum
- SPIECKER, W. (1980): Der Einfluß der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration auf mechanische und elektrophysiologische Eigenschaften der Skelettmuskelfaser des Frosches. Dissertation, Abteilung Biologie der Ruhr-Universität Bochum
- STEFANI, E. & CHIARANDINI, D.J. (1973): Skeletal muscle: Dependence of potassium contractures on extracellular calcium. *Pflügers Arch.* 343, 143-150
- STEPHENSON, E.W. (1981): Activation of fast skeletal muscle: contributions of studies on skinned fibers. *Am. J. Physiol.* 240: (Cell Physiol.9) C1-C19
- STRASBURG, G.M., LEAVIS, P.C. & GERGELY, J. (1985): Troponin-C-mediated calcium-sensitive changes in the conformation of troponin I detected by pyrene excimer fluorescence. *J. Biol. Chem.* 260, 366-370
- STRICHARTZ, G.R. (1973): The inhibition of sodium currents in myelinated nerve by quaternary derivatives of lidocaine. *J. gen. Physiol.* 62, 37-57
- SUEMATSU, E., HIRATA, M., HASHIMOTO, T. & KURIYAMA, H. (1984): Inositol 1,4,5-trisphosphate releases Ca^{2+} from intracellular store sites in skinned single cells of porcine coronary artery. *Biochem. biophys. Res. Commun.* 120, 481-485
- TAKAUJI, M. & NAGAI, T. (1977): Effect of dantrolene sodium on the inactivation of excitation contraction coupling in frog skeletal muscle. *Jap. J. Physiol.* 27, 743-754

- TSIEN, R.Y. (1981): A non-disruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells. *Nature, Lond.* 290, 527-528
- TSIEN, R.Y. (1983): Intracellular measurements of ion activities. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 12, 91-116
- VERGARA, J. & TSIEN, R.Y. (1985): Inositol trisphosphate induced contractures in frog skeletal muscle fibers. *Biophys. J.* 47, 351a
- VOLPE, P., SALVIATI, G., DI VIRGILIO, F. & POZZAN, T. (1985): Inositol 1,4,5-trisphosphate induces calcium release from sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. *Nature, Lond.* 316, 347-349

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor
Dr. H. Ch. Lüttgau für seine wissenschaft-
liche Begleitung in den letzten Jahren.
Für das gute Arbeitsklima und für die tat-
kräftige Unterstützung bei der Fertigstel-
lung dieser Arbeit danke ich meinen Kollegen,
vor allem Herrn Dr. Gernot Gottschalk.

Lebenslauf

Name:	Dorothea Berwe, geb. Majewski
Geboren:	21. August 1958
Geburtsort:	Schwelm/Westfalen
Schulbesuch:	1965 - 1968 Volksschule
	1968 - 1977 Gymnasium
	1977 Abitur
Studium und Ausbildung:	1977 - 1978 Studium der Biologie an der Westf. Wilhelms- Universität in Münster
	1978 - 1982 Studium der Biologie an der Ruhr-Universität in Bochum
	1982 Diplom in Biologie
	seit 1983 Dissertation am Lehrstuhl für Zell- physiologie der Abtei- lung Biologie der Ruhr-Universität Bochum

FOTODRUCK J. MAINZ GmbH
Neupforte 13, Nähe Markt, D-5100 Aachen
Telefon: (0241) 27305 und (0241) 38606